

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002年1月3日 (03.01.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/00264 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A61K 48/00, 35/76, C12N 15/86, 7/00      くば市観音台1丁目25番11号 株式会社 ディナベック  
研究所内 Ibaraki (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/05513      (74) 代理人: 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒  
300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階  
Ibaraki (JP).
- (22) 国際出願日: 2001年6月27日 (27.06.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語      (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,  
PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT,  
TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (26) 国際公開の言語: 日本語      (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (30) 優先権データ:  
特願2000-197870      2000年6月27日 (27.06.2000)      JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会  
社 ディナベック研究所 (DNAVEC RESEARCH INC.)  
[JP/JP]; 〒305-0856 茨城県つくば市観音台1丁目25番  
11号 Ibaraki (JP).
- (72) 発明者; および      添付公開書類:  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 今井圓裕 (IMAI,      — 国際調査報告書  
Enyu) [JP/JP]; 〒665-0005 兵庫県宝塚市武庫山2-2-6  
Hyogo (JP). 猪阪善隆 (ISAKA, Yoshitaka) [JP/JP]; 〒  
563-0047 大阪府池田市室町9-12 Osaka (JP). 福村正  
之 (FUKUMURA, Masayuki) [JP/JP]; 〒290-0158 千葉  
県市原市ちはら台4-55-1-1-801 Chiba (JP). 長谷川護  
(HASEGAWA, Mamoru) [JP/JP]; 〒305-0856 茨城県つ
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: VIRUS VECTOR FOR TRANSFERRING GENE INTO RENAL CELLS

(54) 発明の名称: 腎細胞に遺伝子を導入するためのウイルスベクター

(57) Abstract: A virus vector whereby a gene can be transferred into renal cells at a high efficiency. Use of a paramyxovirus vector makes it possible to transfer a gene into renal cells at a high efficiency. The gene transferred by the *in vivo* administration can be continuously expressed in the renal cells over a prolonged period of time. This vector is adequately usable in gene therapy for kidney.

(57) 要約:

本発明は、腎細胞へ高い効率で遺伝子を導入することができるウイルスベクター  
— およびその用途を提供する。パラミクソウイルスベクターを用いることにより  
、腎細胞へ高い効率で遺伝子を導入することが可能である。インビボ投与で導入  
された遺伝子は腎細胞内で長期間にわたり持続的に発現する。本発明のベクター  
は、腎臓を対象とした遺伝子治療に好適に用いられる。

## 明細書

## 腎細胞に遺伝子を導入するためのウイルスベクター

技術分野

本発明は、腎細胞へ遺伝子を導入するためのパラミクソウイルスベクターに関する。

背景技術

近年、哺乳動物細胞への遺伝子導入技術の開発が進み、遺伝子治療によりヒトの様々な疾患を治療する試みに関心が集まっている。生体への遺伝子導入は *in vivo* または *ex vivo* により行われ、*in vivo* による遺伝子導入ではベクターに組み込んだ遺伝子等を生体に投与することにより、*ex vivo* では患者やその他に由来する細胞に遺伝子を導入後、その細胞を生体に戻すことにより行われる。

培養細胞などへ遺伝子を導入する場合と違い、生体の臓器への遺伝子を導入することは一般に容易ではない。特に哺乳動物の腎臓は動静脈、細尿管、糸球体などが入り組んだ構造的に複雑な組織からなり、代謝回転が比較的低いことから、これまで十分な遺伝子導入効率を得ることが困難であった。腎臓の構造は器官としての正常な機能にとって極めて重要であり、遺伝子の導入に際しては器官や組織を傷つけずに操作する必要がある。また、腎臓を構成する種々の細胞の中で、糸球体、尿細管、間質等の細胞を標的として効率よく遺伝子を導入することは困難である。

腎臓への遺伝子導入に関しては、例えばHVJ (hemagglutinating virus of Japan; センダイウイルス) とリポソームを用いた方法が試みられている (Tomita, N. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 186: 129-134, 1992)。SV40 large T抗原を発現するプラスミドベクターとHMG-1 (high mobility group 1) 蛋白質を含む

リボソームを作製し、これをラット腎動脈からカテーテルを介して腎臓へ注入することにより腎臓へ遺伝子を導入した。その結果、導入4日目において15%の糸球体毛細血管細胞でSV40 large T抗原の発現を免疫組織学的に検出することに成功している。しかし、発現レベルは導入後数日をピークに減少し、発現細胞も糸球体の細胞に限られていた。同様のHVJ-リボソームを用いた実験により、イヌ腎臓にヒトCD59遺伝子を導入する試みも行われている (Akami, T. et al., Transplantation Proceedings 26: 1315-1317, 1994)。しかし、糸球体細胞でのCD59遺伝子の発現は一過的で十分なものではなかった。HVJ-リボソームを用いた遺伝子導入では、リボソームの調製方法の改良も行われている (Tsujiie, M. et al., Kidney Int. 57: 1973-1980, 2000)。しかし、遺伝子導入効率は未だ満足できるものではない。また、HVJ-リボソームの調製は煩雑であり、調製した組成物の安定性は十分とは言えない。

カチオニックリボソームとプラスミドDNAの混合物を用いた遺伝子導入において、Zhuらは成獣マウスの様々な組織への遺伝子導入を報告している (Zhu, N. et al., Science 261(5118): 209-11, 1993)。血管へのベクター混合物の注入により、肺、脾臓、リンパ節、骨髄などの組織の細胞に短時間の発現が見られた。また、腎臓の内皮細胞の25~50%に遺伝子がトランスフェクトされたことが報告されている。しかし、糸球体細胞に遺伝子を導入できるのかは示されていない。また、発現期間も示されていない。

ウイルスベクターを用いた腎臓への遺伝子導入としては、アデノウイルスベクターを用いた例も報告されている (Moullier, P. et al., Kidney Int. 45(4): 1220-5, 1994)。βガラクトシダーゼ遺伝子を含む複製能を欠失させたアデノウイルスを腎動脈からの灌流、またはカテーテルを介して腎盂から注入して逆行させることにより成獣ラット腎臓へ遺伝子を導入した。腎動脈から灌流させた場合には、一過的な低レベルのβガラクトシダーゼの発現が観察され、逆行注入の場合には、腎乳頭および髄質の尿細管で発現が見られた。しかし腎内皮細胞では発現

が見られなかった。一般にアデノウイルスベクターを血管内に注入して感染させても、腎細胞への感染効率は十分ではない。アデノウイルスを用いた遺伝子導入方法ではいくつかの改良も行われている（米国特許第5869230号）。ここでは、ベクター導入時に腎臓を氷上などで冷却して虚血傷害を予防することや、ヘモグロビン等の酸素供給剤で細胞の酸素欠乏を防止すること、またドーパミンなどの血管拡張剤を併用することによりベクター感染を調節することについて記載されている。そしてこの方法により腎臓内皮細胞の約5～15%にベクターを導入できることが記載されている。

しかし、アデノウイルスベクターは比較的高い免疫反応を誘発することが知られ、初期段階の非特異的な炎症反応に続き細胞傷害性Tリンパ球を介した特異的免疫反応により導入細胞が攻撃される。遺伝子の欠損や改変により免疫原性を低下させたアデノウイルスベクターの開発も試みられているが、未だ十分とは言えない。

遺伝子治療に用いられるウイルスベクターとしてはレトロウイルスベクターも知られている。レトロウイルスベクターは宿主の染色体に遺伝子を挿入するため、導入遺伝子を長期間安定して発現させることができる利点があるが、一般に標的となる細胞のタイプに制限があり、また、分裂細胞である必要がある。腎臓の細胞の多くは最終分化した非分裂細胞であるため、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療は主に *ex vivo* に制限される。このため、シュードタイプ化やレンチウイルスを基にしたベクターが開発されているが、染色体へのランダムな挿入による癌遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の欠損などのリスクが存在する。また、高力価のウイルスベクターを調製することが難しいなどの欠点が存在する。

#### 発明の開示

本発明は、高い効率で腎細胞へ遺伝子を導入できるウイルスベクターおよびその用途を提供することを課題とする。より詳しくは、本発明は、腎細胞へ遺伝子



導入するために用いるパラミクソウイルスベクター、該ベクターを含む腎細胞への遺伝子導入用組成物、および該ベクターを利用して腎細胞へ遺伝子導入する方法を提供する。

近年、センダイウイルスを含むパラミクソウイルスのリバーシジェネティクスにより遺伝子導入用の組換えウイルスベクターが開発されている (Kato, A. et al., *Genes Cells* 1: 569-579, 1996; Kato, A. et al., *EMBO J.* 16: 578-587, 1997; Yu, D. et al., *Genes Cells* 2: 457-466, 1997; Hasan, M. K. et al., *J. Gen. Virol.* 78: 2813-2820, 1997; Sakai, Y. et al., *FEBS Lett.* 456: 221-226, 1999)。そこで、この組換えセンダイウイルスベクターを用いて腎への遺伝子導入を行い、このベクターが現在の遺伝子導入ベクターが抱える障害を克服することができるかについて検討した。すなわち、臨床を考慮した上で、トランスフェクション効率、遺伝子発現効率、遺伝子発現の持続性、およびベクターの投与経路の影響を含む、*in vivo* におけるセンダイウイルスベクターのトランスフェクション活性を検討した。

その結果、*in vivo* において、外来遺伝子を保持する組換えセンダイウイルスベクターが腎細胞へ極めて高い効率で遺伝子を導入する能力を示すことが判明した。腎動脈からの灌流、および尿管からの逆行のいずれの投与方法においても、腎臓の広い範囲にわたり瀰漫性に腎細胞へ遺伝子導入が可能であり、特に腎動脈から投与した場合には、間質細胞、糸球体細胞などの細胞で高いGFPの発現が観察された。センダイウイルスにより導入された遺伝子の発現は少なくとも約1箇月にわたり持続し、長期間経過した腎組織では尿細管細胞での導入遺伝子の発現も見られた。また、尿管からの逆行投与では、主に尿細管細胞（遠位尿細管および近位尿細管）で発現が見られ、間質細胞にも発現が観察された。

すなわち、本発明者らは、組換えパラミクソウイルスベクターが、1) 腎細胞に高い効率で遺伝子を発現させることが可能であり、2) 投与経路により異なる細胞に遺伝子を導入することができ、腎動脈からの投与では、間質細胞および糸

球体組織近傍へのマクロファージの浸潤が起こらないこと、3) ウイルスゲノムおよび外来遺伝子の発現は長期間安定であることを見出した。これらの結果は、パラミクソウイルスベクターが腎への遺伝子導入に有用であることを実証するものである。現在、腎への遺伝子導入研究の分野ではアデノウイルスベクターの使用が試行されているが、本発明のパラミクソウイルスベクターは、腎への遺伝子導入にとってアデノウイルスと同等またはそれ以上の適合性を有するベクターであり得る。アデノウイルスベクターには、導入遺伝子の高発現と高い導入効率が細胞周期によらないなど、幾つかの重要な利点を有しているが、組換えパラミクソウイルスにおいてもそれらは共通している。

アデノウイルスベクターにおいては、短時間感染時間では標的細胞に十分な感染効率が得られないことがしばしば問題となっている。これはコクサッキー-アデノウイルス受容体 (CAR) を介してベクター粒子が細胞内に取り込まれるためには、長時間の接触が必要であるためと考えられている。腎臓へのインビボ投与においては、投与時に血流を遮断する時間が長いと虚血傷害による組織の破壊が起こることから、長い時間血流を遮断することは好ましくない。これに対しパラミクソウイルスは、短時間の細胞への露出でも十分な感染効率が得られることから、臨床における遺伝子導入に極めて大きい利点を有している。パラミクソウイルスベクターのこのような特徴を考慮すること、本発明のパラミクソウイルスベクターは、様々な臨床状況における遺伝子治療に極めて有望なベクターとなると考えられる。

即ち、本発明は、腎細胞への遺伝子導入用パラミクソウイルスベクターおよびそれを用いた遺伝子導入方法に関し、より具体的には、

(1) パラミクソウイルスベクターを腎細胞に接触させる工程を含む、腎細胞へ遺伝子を導入する方法、

(2) パラミクソウイルスベクターを血管内に投与する工程を含む、(1)に記載の方法、

- (3) 血管が腎動脈である、(2)に記載の方法、
- (4) パラミクソウイルスベクターを尿管内に投与する工程を含む、(1)に記載の方法、
- (5) 腎細胞が間質細胞、糸球体細胞、および尿細管細胞からなる群より選択される細胞である、(1)から(4)のいずれかに記載の方法、
- (6) パラミクソウイルスがセンダイウイルスである、(1)から(5)のいずれかに記載の方法、
- (7) 腎細胞へ遺伝子を導入するために用いる、パラミクソウイルスベクター、
- (8) パラミクソウイルスベクターまたは該ベクターを含む細胞を含む、腎細胞への遺伝子導入用組成物、
- (9) 血管内に投与するために用いられる、(8)に記載の組成物、
- (10) 血管が腎動脈である、(9)に記載の組成物、
- (11) 尿管内に投与するために用いられる、(8)に記載の組成物、
- (12) 腎細胞が間質細胞、糸球体細胞、および尿細管細胞からなる群より選択される細胞である、(8)から(11)のいずれかに記載の組成物、ならびに
- (13) パラミクソウイルスがセンダイウイルスである、(8)から(12)のいずれかに記載の組成物、に関する。

本発明において「パラミクソウイルスベクター」とは、パラミクソウイルスに由来し遺伝子を宿主細胞に導入するベクター（担体）を指す。本発明のパラミクソウイルスベクターはリボ核タンパク質（RNP）であってもよく、また、感染力を持つウイルス粒子であってもよい。ここで「感染力」とは、組換えパラミクソウイルスベクターが細胞への接着能および膜融合能を保持していることにより、接着した細胞の内部にベクター内部の遺伝子を導入することのできる能力のことを言う。好ましい態様では、本発明のパラミクソウイルスベクターは、外来遺伝子を発現することができるように保持する。本発明のパラミクソウイルスベクターは、複製能を有していてもよく、複製能を有さない欠損型ベクターであってもよ

い。「複製能を有する」とは、ウイルスベクターが宿主細胞に感染した場合、該細胞においてウイルスが複製され、感染性ウイルス粒子が産生されることを指す。

「組み換え」体とは、組み換えポリヌクレオチドを介して生成した化合物または組成物を言う。組み換えポリヌクレオチドとは、自然の状態と同じようには結合していないポリヌクレオチドを言う。本明細書において、「組換え」パラミクソウイルスベクターとは、遺伝子操作により構築されたパラミクソウイルスベクターまたはそれを増幅して得られるパラミクソウイルスベクターを言う。組換えパラミクソウイルスベクターは、例えば、組換えパラミクソウイルスcDNAを再構成して生成することができる。

本発明においてパラミクソウイルスとはパラミクソウイルス科に属するウイルスまたはその誘導体を指す。本発明を適用可能なパラミクソウイルスとしては、例えばパラミクソウイルス科の(*Paramyxoviridae*)のセンダイウイルス(Sendai virus)、ニューカッスル病ウイルス(Newcastle disease virus)、おたふくかぜウイルス(Mumps virus)、麻疹ウイルス(Measles virus)、RSウイルス(Respiratory syncytial virus)、牛痘ウイルス(rinderpest virus)、ジステンパーウイルス(distemper virus)、サルパラインフルエンザウイルス(SV5)、ヒトパラインフルエンザウイルス1, 2, 3型等が挙げられる。本発明のウイルスは、好ましくはパラミクソウイルス属(*Paramyxovirus*)に属するウイルスまたはその誘導体である。本発明を適用可能なパラミクソウイルスとしては、例えばヒトパラインフルエンザウイルス1型(HPIV-1)、ヒトパラインフルエンザウイルス3型(HPIV-3)、ウシパラインフルエンザウイルス3型(BPIV-3)、センダイウイルス(Sendai virus; マウスパラインフルエンザウイルス1型とも呼ばれる)、およびサルパラインフルエンザウイルス10型(SPIV-10)などが含まれる。本発明のパラミクソウイルスは、最も好ましくはセンダイウイルスである。これらのウイルスは、天然株、野生株、変異株、ラゴ継代株、および人為的に構築された株などであり得る。DI粒子(J. Virol. 68, 8413-8417(1994))等の不完全ウイルスや、合成したオリゴヌクレ

オチド等も、本発明のウイルスベクターを製造するための材料として使用することができる。

パラミクソウイルスのウイルスタンパク質をコードする遺伝子としては、NP、P、M、F、HN、およびL遺伝子が含まれる。「NP、P、M、F、HN、およびL遺伝子」とは、それぞれヌクレオキャプシド、ホスホ、マトリックス、フュージョン、ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ、およびラージ蛋白質をコードする遺伝子のことを指す。パラミクソウイルス亜科に属する各ウイルスにおける各遺伝子は、一般に次のように表記される。一般に、NP遺伝子は「N遺伝子」と表記されることもある。

パラミクソウイルス属	NP	P/C/V	M	F	HN	-	L
ルブラウイルス属	NP	P/V	M	F	HN (SH)		L
モービリウイルス属	NP	P/C/V	M	F	H	-	L

例えばパラミクソウイルス科 (*Paramyxoviridae*) のレスピロウイルス (*Respirovirus*) にも分類されるセンダイウイルスの各遺伝子の塩基配列のデータベースのアクセッション番号は、NP遺伝子については M29343、M30202、M30203、M30204、M51331、M55565、M69046、X17218、P遺伝子については M30202、M30203、M30204、M55565、M69046、X00583、X17007、X17008、M遺伝子については D11446、K02742、M30202、M30203、M30204、M69046、U31956、X00584、X53056、F遺伝子については D00152、D11446、D17334、D17335、M30202、M30203、M30204、M69046、X00152、X02131、HN遺伝子については D26475、M12397、M30202、M30203、M30204、M69046、X00586、X02808、X56131、L遺伝子については D00053、M30202、M30203、M30204、M69040、X00587、X58886を参照のこと。

本発明において「遺伝子」とは遺伝物質を指し、RNAおよびDNA等の核酸が含まれる。遺伝子は蛋白質をコードしてもよく、また蛋白質をコードしていなくてもよい。例えば遺伝子はリボザイムまたはアンチセンスRNAなどの機能的RNAをコードするものであってもよい。遺伝子は天然由来または人為的に設計された配列で

あり得る。また、本発明において「DNA」とは、一本鎖DNAおよび二本鎖DNAを含む。

「腎細胞」とは、哺乳動物の正常腎臓に含まれる細胞、および病的腎臓に浸潤している細胞が含まれる。腎臓に浸潤している細胞には、例えば単球 (monocytes)、マクロファージ (macrophages)、リンパ球 (leukocytes) などが挙げられる。

具体的には、哺乳動物の腎臓は、少なくとも15種類の細胞からなっており、

糸球体細胞 (glomerular cell)

メサングウム細胞 (mesangial cell)

間質細胞 (interstitial cell)

尿細管細胞 (renal tubular cell)

足細胞 (podocyte)

内皮細胞 (endothelial cell)

などが含まれる。また糸球体基底膜 (GBM) および上皮細胞なども挙げられる。本発明において、これらの細胞は腎細胞に含まれる。

腎動脈とは、腎臓内または腎臓に至る動脈を指し、腹部大動脈 (abdominal aorta) から分岐する腎動脈およびそれより下流の小葉間動脈、右腎動脈、左腎動脈、腎門の近くで分岐した動脈、および5本の区域動脈 (segmental artery)、およびそれより下流の弓状動脈を含む。腎静脈とは、腎臓内または腎臓から出る静脈を指し、右腎静脈、左腎静脈、小葉間静脈、星状静脈、弓状静脈、および葉間静脈を含む。

本発明は、パラミクソウイルスベクターの腎細胞へ遺伝子導入用途を提供する。本発明者等は、パラミクソウイルスが極めて高い効率で腎細胞へ遺伝子を導入することができることを見出した。本発明者等による実験では、腎臓の広範囲の領域で導入遺伝子の発現が検出された。特に、腎動脈からの注入では、主に間質細胞および糸球体細胞への遺伝子導入が確認された。これらの細胞は腎疾患における標的細胞として重要であり、本発明のベクターは腎疾患の遺伝子治療に好適

に用いられ得る。

また、本発明者等により、組換えパラミクソウイルスベクターを利用して腎細胞に導入された遺伝子が少なくとも1箇月にわたり持続的な発現を示すことが示された。このことは、組換えパラミクソウイルスベクターを利用して腎細胞を標的とした遺伝子治療を行った場合に、持続的な治療効果を得ることができるという利点をもたらす。

また、安全性の面においても、パラミクソウイルスベクターはヒトへの遺伝子治療の臨床試験に好適に用いられうる可能性が示唆される。第一に、外来遺伝子の発現は、導入したDNAの核局在化が必要であることが、遺伝子導入の成功率を低下させる主要な障害になっている。しかし、例えばセンダイウイルスなどの場合、外来遺伝子の発現は、細胞質内において細胞性チューブリンおよび自身が持つRNAポリメラーゼ(L蛋白質)の両方によって駆動される。これはまた、センダイウイルスが宿主のゲノムと相互作用しないことを示しており、癌化などの安全面における問題が生じないと考えられる。第二に、センダイウイルスは齧歯類にとっては病原性で肺炎を生じることが知られているが、人には病原性ではない。これはまた、野生型センダイウイルスの経鼻的投与によって非ヒト霊長類において重篤な有害作用を示さないというこれまでの報告によっても支持されている(Hurwitz, J. L. et al., Vaccine 15: 533-540, 1997)。センダイウイルスのこれらの特徴は、センダイウイルスベクターが、ヒトの治療へ応用しうることを示唆し、センダイウイルスベクターが、腎細胞への遺伝子治療の有望な選択肢の一つとなることを結論づけるものである。

このようにパラミクソウイルスベクターが腎細胞への遺伝子導入において様々な利点を有するという本発明により得られた知見は、特に、腎細胞を標的とした遺伝子治療などにおいて大きな進歩をもたらす可能性を示している。

本発明において腎細胞への遺伝子導入に用いるパラミクソウイルスベクターとしては、特に制限はない。好適なパラミクソウイルスベクターとして、例えば、

複製能を有し、自立的に増殖するようなベクターが挙げられる。例えば、一般に天然型パラミクソウイルスのゲノムは、3'の短いリーダー領域に続き、N（ヌクレオキャプシド）、P（ホスホ）、M（マトリックス）、F（フュージョン）、HN（ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ）、およびL（ラージ）蛋白質をコードする6つの遺伝子が並んでおり、短い5'トレイラー領域を他端に有する。これと同様の構造を有するゲノムを設計することにより、自律複製可能な本発明のベクターを製造することができる。また、ゲノム内に外来遺伝子を挿入することにより、外来遺伝子を発現するベクターを製造することができる。なお、本発明のパラミクソウイルスベクターにおいては、ベクター上のウイルス遺伝子の配置は野生型ウイルスから改変されていてもよい。

また、本発明に用いるパラミクソウイルスベクターとしては、野生型パラミクソウイルスが持つ遺伝子のいずれかを欠損したものであってもよい。例えば、センドライウイルスベクターを再構成させる場合、NP、P/CおよびL遺伝子から作られる蛋白質群がトランスに必要だと考えられているが、該蛋白質群をコードする遺伝子自体は、本発明のウイルスベクターに必ずしも含まれている必要はない。例えば、該蛋白質群をコードする遺伝子を有する発現ベクターを、ベクターゲノムをコードする発現ベクターと共に宿主細胞にトランスフェクションすることにより、再構成を行うことができる。また、該蛋白質群をコードする遺伝子を有する宿主細胞にベクターゲノムをコードする発現ベクターを導入し、該宿主細胞から該蛋白質群を供給して再構成を行ってもよい。これらの蛋白質群のアミノ酸配列は、ウイルス由来の配列そのままでもなくとも、核酸の導入における活性が天然型のそれと同等かそれ以上ならば、変異を導入したり、あるいは他のウイルスの相同遺伝子で代用してもよい。

また、パラミクソウイルスベクターが細胞に伝播してゆくためには、M、FおよびHN遺伝子から作られる蛋白質群が必要だと考えられているが、パラミクソウイルスベクターをRNPとして調製する場合は、これらの蛋白質は必要ない。RNPに含



まれるゲノムに、M、FおよびHN遺伝子が含まれていれば、宿主に導入された時に、これらの遺伝子産物が生産され、感染性のあるウイルス粒子が形成される。感染性ウイルスを産生するRNPベクターとしては、例えば N、P、M、F、HN、およびL遺伝子をコードするウイルスゲノムRNAと、N蛋白質、P蛋白質、およびL蛋白質を含むRNPが挙げられる。このようなRNPを細胞内に導入すると、N蛋白質、P蛋白質、およびL蛋白質の働きによりウイルスゲノムが発現、複製され、感染性ウイルスベクターが増幅する。

RNPを細胞に導入するには、例えばリポフェクトアミンやポリカチオニックリポソームなどと共に複合体を形成させて導入することが可能である。具体的には、種々のトランスフェクション試薬が利用できる。例えば、DOTMA (Boehringer)、Superfect (QIAGEN #301305)、DOTAP、DOPE、DOSPER (Boehringer #1811169) などが挙げられる。エンドソーム中での分解を防ぐため、クロロキンを加えることもできる (Calos, M. P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015)。複製型ウイルスの場合、産生されたウイルスは、培養細胞、鶏卵、個体（例えばマウスなどの哺乳動物）などに再感染させて増幅または継代することができる。

逆に、M、Fおよび/またはHN遺伝子が含まれていないパラミクソウイルスベクターも、本発明のパラミクソウイルスベクターとして用いることができる。このようなウイルスベクターの再構成は、例えば、欠損している遺伝子産物を外来的に供給することにより行うことができる。このようにして製造されたウイルスベクターは、野生型ウイルスと同様に宿主細胞に接着して細胞融合を起こすが、細胞に導入されたベクターゲノムはこれらのいずれかの遺伝子を欠損しているため、最初と同じような感染力を持つ娘ウイルス粒子は形成されない。このため、一回限りの遺伝子導入力を持つ安全なウイルスベクターとして有用である。ゲノムから欠損させる遺伝子としては、例えばF遺伝子および/またはHN遺伝子が挙げられる。例えば、F遺伝子が欠損した組換えパラミクソウイルスベクターゲノムを発現するプラスミドを、F蛋白質の発現ベクターならびにNP、P/CおよびL蛋白質の発現

ベクターと共に宿主細胞にトランスフェクションすることにより、ウイルスベクターの再構成を行うことができる（国際公開番号 W000/70055 および W000/70070）。また、例えば、F遺伝子が染色体に組込まれた宿主細胞を用いて製造することもできる。これらの蛋白質群を外から供給する場合、そのアミノ酸配列はウイルス由来の配列そのままでも、核酸の導入における活性が天然型のそれと同等かそれ以上ならば、変異を導入したり、あるいは他のウイルスの相同遺伝子で代用してもよい。

また、ベクターゲノムが由来するウイルスのエンベロープ蛋白質とは異なる蛋白質をベクターのエンベロープに含むベクターを作製することもできる。このようなタンパク質に特に制限はない。例えば、他のウイルスのエンベロープタンパク質、例えば水疱性口内炎ウイルス（VSV）のGタンパク質（VSV-G）を挙げることができる。本発明のパラミクソウイルスベクターは、VSV-Gタンパク質などのように、ゲノムが由来するウイルス以外のウイルスに由来するエンベロープタンパク質を含むシュードタイプウイルスベクターが含まれる。

また、本発明のパラミクソウイルスベクターは、例えば、エンベロープ表面に特定の細胞に接着しうるような接着因子、リガンド、受容体等の蛋白質、あるいはこれらの蛋白質を細胞外領域に有し、ウイルスエンベロープ由来のポリペプチドを細胞内領域に有するキメラタンパク質などを含むものであってもよい。これにより、特定の組織を標的とするベクターを作り出すこともできる。これらはウイルスゲノムにコードされていてもよいし、ウイルスベクターの再構成時に、ゲノム以外の遺伝子（例えば別の発現ベクターまたは宿主染色体などの遺伝子）の発現により供給されてもよい。

また、本発明のウイルスベクターは、例えば、免疫原性を低下させるために、または、RNAの転写効率や複製効率を高めるために、ベクターに含まれるウイルス遺伝子が改変されたものであってもよい。具体的には、例えば複製因子であるNP遺伝子、P/C遺伝子およびL遺伝子の少なくとも一つを改変し、転写または複製の

機能を高めることが考えられる。また、構造体蛋白質の1つであるHN蛋白質は、赤血球凝集素であるヘマグルチニン (hemagglutinin) 活性とノイラミニダーゼ (neuraminidase) 活性との両者の活性を有するが、例えば前者の活性を弱めることができれば、血液中でのウイルスの安定性を向上させることが可能であろうし、例えば後者の活性を改変することにより、感染能を調節することも可能である。また、膜融合に関わるF蛋白質を改変することにより、膜融合リポソームの融合能を調節することもできる。また、例えば、細胞表面の抗原分子となりうるF蛋白質やHN蛋白質の抗原提示エピトープ等を解析し、これを利用して抗原提示能を弱めたパラミクソウイルスを作製することもできる。

また、本発明のワクチンに用いられるSeVは、アクセサリ遺伝子が欠損したものであってよい。例えばSeVのアクセサリ遺伝子の1つであるV遺伝子をノックアウトすることにより、培養細胞における遺伝子発現や複製は障害されることなく、マウス等の宿主に対するSeVの病原性が顕著に減少する (Kato, A. et al. 1997. J. Virol. 71:7266-7272; Kato, A. et al. 1997. EMBO J. 16:578-587; Curran, J. et al., WO01/04272, EP1067179)。このような弱毒化ベクターは、本発明のワクチンを構成するベクターとして特に好適である。

本発明のウイルスベクターは、ゲノムRNA中に外来遺伝子をコードし得る。外来遺伝子を含む組換えパラミクソウイルスベクターは、上記のパラミクソウイルスベクターゲノムに外来遺伝子を挿入することによって得られる。外来遺伝子としては、標的とする腎細胞において発現させたい所望の遺伝子を用いることができる。外来遺伝子は天然型蛋白質をコードする遺伝子であってもよく、また天然型蛋白質と同等の機能を有する蛋白質をコードする限り、欠失、置換または挿入により天然型蛋白質を改変した蛋白質をコードする遺伝子であってもよい。あるいは、天然型蛋白質の欠失型や人工的な蛋白質などであってもよい。例えば、遺伝子治療などを目的とする場合には、該ウイルスベクターDNAに対象となる疾患の治療用遺伝子を挿入する。ウイルスベクターDNAに外来遺伝子を導入する場合は、例

例えば、センダイウイルスベクターDNAにおいては、転写終結(E)配列と転写開始(S)配列との間などに、6の倍数の塩基数を有する配列を挿入することが望ましい (Journal of Virology, Vol. 67, No. 8, 1993, p. 4822-4830)。外来遺伝子は、ウイルスの各遺伝子 (NP、P、M、F、HN、およびL遺伝子) の前および/または後ろに挿入することができる。前後の遺伝子の発現を妨げないようにするため、外来遺伝子の前または後ろに適宜 E-I-S配列 (転写開始配列-介在配列-転写終結配列) またはその部分を挿入し、各遺伝子の間にE-I-S配列を配置する。あるいは、IRESを介して外来遺伝子を挿入することもできる。

挿入した外来性遺伝子の発現量は、外来遺伝子の上流に付加する転写開始配列の種類により調節することができる。また、遺伝子挿入の位置、および遺伝子の前後の塩基配列により調節する。例えば、センダイウイルスにおいては、挿入位置がウイルスゲノムのネガティブ鎖RNAの3' 端に近いほど(野生型ウイルスのゲノム上の遺伝子配置においては、NP遺伝子に近いほど)、挿入された遺伝子の発現量が高い。外来遺伝子の高い発現を得るためには、外来遺伝子をNP遺伝子の上流 (マイナス鎖においては3' 側) またはNP遺伝子とP遺伝子の間など、上流領域 (ネガティブ鎖ゲノムにおいて3' 側) に挿入することが好ましい。逆に、挿入位置がネガティブ鎖RNAの5' 端に近いほど(野生型ウイルスのゲノム上の遺伝子配置においては、L遺伝子に近いほど)、挿入された遺伝子の発現量が低くなる。外来遺伝子の発現を低く抑えるためには、例えばネガティブ鎖の最も5' 側、すなわち野生型ウイルスゲノムにおいてはL遺伝子の下流 (ネガティブ鎖においてはL遺伝子の5' 隣接部位)、またはL遺伝子の上流 (ネガティブ鎖においてはL遺伝子の3' 隣接部位) に外来遺伝子を挿入する。このように、外来遺伝子の挿入位置は、該遺伝子の所望の発現量を得るために、また前後のウイルスタンパク質をコードする遺伝子との組み合わせが最適となる様に適宜調節することができる。例えば、高力価ウイルスベクターの投与による導入遺伝子の高発現が毒性を示す場合は、投与するウイルス力価を制限することができる他、例えばベクターにおける外来遺伝子

の挿入位置をネガティブ鎖のなるべく5'側に設定したり、転写開始配列を効率の低いものにするなどして、個々のSeVベクターからの発現レベルを低く抑えることで適切な効果が得られるすることも可能である。

一般に、細胞毒性を示さない限りにおいて、抗原蛋白質の高い発現が得られれば、免疫獲得に有利と考えられるため、抗原蛋白質をコードする遺伝子は、効率の高い転写開始配列に連結し、ネガティブ鎖ゲノムの3'端近くに挿入することが好ましい。好適なベクターの例としては、外来遺伝子が、パラミクソウイルスベクターのネガティブ鎖ゲノムにおいて、該パラミクソウイルスのウイルス蛋白質のいずれよりも3'側に配置されているベクターが挙げられる。例えばN遺伝子の上流（ネガティブ鎖の3'側）に外来遺伝子が挿入されたベクターが好ましい。あるいは、N遺伝子のすぐ下流に挿入してもよい。

外来遺伝子を容易に挿入できるようにするために、挿入部位にクローニングサイトを設計することができる。クローニングサイトは、例えば制限酵素の認識配列とすることができる。ゲノムをコードするベクターDNA中の当該制限酵素部位に外来遺伝子断片を挿入することができる。クローニングサイトは、複数の制限酵素認識配列を有する、いわゆるマルチクローニングサイトとしてもよい。また、本発明のベクターは、このように挿入した以外に位置に他の外来遺伝子を保持していてもよい。

外来遺伝子を有する組換えセンダイウイルスベクターは、例えば、Hasan, M. K. et al. J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997; Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587及びYu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466の記載に準じて、次のようにして構築することができる。

まず、所望の外来遺伝子のcDNA塩基配列を含むDNA試料を用意する。DNA試料は、25ng/ $\mu$ l以上の濃度で電気泳動的に単一のプラスミドと確認できることが好ましい。以下、外来遺伝子をNotI部位を利用してウイルスゲノムをコードするDNAに挿入する場合を例にとって説明する。目的とするcDNA塩基配列の中にNotI認識

部位が含まれる場合は、部位特異的変異挿入法などを用いて、コードするアミノ酸配列を変化させないように塩基配列を改変し、NotI部位を予め除去しておくことが好ましい。この試料から所望の遺伝子断片をPCRにより増幅回収する。増幅された断片の両端がNotI部位とし、さらに一端にセンダイウイルスの転写終結配列 (E)、介在配列 (I) 及び転写開始配列 (S) (EIS配列) のコピーを付加するために、NotI制限酵素切断部位配列及び転写終結配列 (E)、介在配列 (I) 及び転写開始配列 (S) と目的遺伝子の一部の配列を含むプライマー対として、フォワード側 (センス鎖) 合成DNA配列及びリバース側 (アンチセンス鎖) 合成DNA配列 (プライマー対) を作成する。

例えば、フォワード側合成DNA配列は、NotIによる切断を保証するために 5' 側に任意の 2 以上のヌクレオチド (好ましくはGCGおよびGCCなどのNotI認識部位由来の配列が含まれない 4 塩基、更に好ましくはACTT) を選択し、その3' 側にNotI認識部位gcggccgcを付加し、さらにその3' 側にスペーサー配列として任意の 9 塩基または 9 に 6 の倍数を加えた数の塩基を付加し、さらにその3' 側に所望のcDNAの開始コドンATGからこれを含めてORFの約25塩基相当の配列を付加した形態とする。最後の塩基はGまたはCとなるように該所望のcDNAから約25塩基を選択してフォワード側合成オリゴDNAの3' の末端とすることが好ましい。

リバース側合成DNA配列は5' 側から任意の 2 以上のヌクレオチド (好ましくはGCGおよびGCCなどのNotI認識部位由来の配列が含まれない 4 塩基、更に好ましくはACTT) を選択し、その3' 側にNotI認識部位gcggccgcを付加し、さらにその3' 側に長さを調節するための挿入断片のオリゴDNAを付加する。このオリゴDNAの長さは、NotI認識部位gcggccgcを含め、cDNAの相補鎖塩基配列と後述するセンダイウイルスに由来するセンダイウイルスゲノムのE I S塩基配列の合計が 6 の倍数になるように塩基数を設計する (いわゆる「6のルール (rule of six)」; Kolakofski, D. et al., J. Virol. 72:891-899, 1998; Calain, P. and Roux, L., J. Virol. 67: 4822-4830, 1993)。さらに挿入断片の3' 側にセンダイウイルスのS配列の相

補鎖配列、好ましくは5'-CTTTCACCCT-3' (配列番号: 1)、I配列、好ましくは5'-AAG-3'、E配列の相補鎖配列、好ましくは5'-TTTTTCTTACTACGG-3' (配列番号: 2)、さらにその3'側に所望のcDNA配列の終始コドンから逆に数えて約25塩基相当の相補鎖の最後の塩基がGまたはCになるように長さを選択して配列を付加し、リバース側合成オリゴDNAの3'の末端とする。

PCRは、例えば、ExTaqポリメラーゼ (宝酒造) を用いる通常の方法を用いることができる。好ましくはVentポリメラーゼ (NEB) を用いて行い、増幅した目的断片はNotIで消化した後、プラスミドベクターpBluescriptのNotI部位に挿入する。得られたPCR産物の塩基配列をシークエンサーで確認し、正しい配列のプラスミドを選択する。このプラスミドから挿入断片をNotIで切り出し、パラミクソウイルスゲノムcDNAを含むプラスミドのNotI部位にクローニングする。またプラスミドベクターpBluescriptを介さずにNotI部位に直接挿入し、組換えパラミクソウイルスcDNAを得ることも可能である。

例えば、組み換えセンダイウイルスゲノムcDNAであれば、文献記載の方法に準じて構築することができる (Yu, D. et al., Genes Cells 2: 457-466, 1997; Hasan, M. K. et al. J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997)。例えば、まずNotI制限部位を有する18bpのスペーサー配列 (5'-(G)-CGGCCGAGATCTTCACG-3') (配列番号: 3) を、クローニングされたセンダイウイルスゲノムcDNA (pSeV(+)) のリーダー配列とN-タンパク質をコードする配列の5'末端との間の隣接遺伝子座に挿入し、デルタ肝炎ウイルスのアンチゲノム鎖 (antigenomic strand) 由来の自己開裂リボザイム部位を含むプラスミドpSeV18\*b(+)を得る (Hasan, M. K. et al., 1997, J. General Virology 78: 2813-2820)。pSeV18\*b(+)のNotI部位に外来遺伝子断片を挿入し、所望の外来遺伝子が組込まれた組み換えセンダイウイルスcDNAを得ることができる。

ウイルスゲノムをコードするDNAは、適当な転写プロモーターを連結してベクターDNAを構築し、これを試験管内または細胞内で転写させ、パラミクソウイルスの

L、P、およびNPタンパク質の共存下でRNPを再構成させることにより、このRNPを含むウイルスベクターを生成させることができる。本発明は、パラミクソウイルスベクターのゲノムDNAを転写させる工程を含む、腎細胞へ遺伝子を導入するために用いるパラミクソウイルスベクターまたは該ベクターを含む腎細胞への遺伝子導入用組成物の製造方法を提供する。また本発明は、該DNAからなる、本発明のパラミクソウイルスベクターまたは該ベクターを含む腎細胞への遺伝子導入用組成物の成分として用いるパラミクソウイルスベクター製造用DNAを提供する。また本発明は、本発明のパラミクソウイルスベクターまたは該ベクターを含む腎細胞への遺伝子導入用組成物の成分となるパラミクソウイルスベクターを製造するための、該ベクターのゲノムをコードするDNAの使用に関する。ウイルスベクターDNAからのウイルスの再構成は公知の方法に従って行うことができる（国際公開97/16539号；国際公開97/16538号；Durbin, A. P. et al., 1997, *Virology* 235: 323-332；Whelan, S. P. et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8388-8392；Schnell, M. J. et al., 1994, *EMBO J.* 13: 4195-4203；Radecke, F. et al., 1995, *EMBO J.* 14: 5773-5784；Lawson, N. D. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4477-4481；Garcin, D. et al., 1995, *EMBO J.* 14: 6087-6094；Kato, A. et al., 1996, *Genes Cells* 1: 569-579；Baron, M. D. and Barrett, T., 1997, *J. Virol.* 71: 1265-1271；Bridgen, A. and Elliott, R. M., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 15400-15404）。これらの方法により、パラインフルエンザ、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス、麻疹ウイルス、リンダーペストウイルス、センダイウイルスなどを含むパラミクソウイルスベクターをDNAから再構成させることができる。ウイルスベクターDNAにおいて、F遺伝子、HN遺伝子、および/またはM遺伝子を欠失させた場合には、そのままでは感染性のウイルス粒子を形成しないが、宿主細胞に、これら欠失させた遺伝子および/または他のウイルスのエンベロープ蛋白質をコードする遺伝子などを別途、導入し発現させることにより、感染性のウイルス粒子を形成させることが可能である。



例えば、ベクターDNAを細胞内に導入する方法には、次のような方法、①目的の細胞が取り込めるようなDNA沈殿物を作る方法、②目的の細胞による取りこみに適し、かつ細胞毒性の少ない陽電荷特性を持つDNAを含む複合体を作る方法、③目的の細胞膜に、DNA分子が通り抜けられるだけに十分な穴を電気パルスによって瞬間的に開ける方法などがある。

②としては、種々のトランスフェクション試薬が利用できる。例えば、DOTMA (Boehringer)、Superfect (QIAGEN #301305)、DOTAP、DOPE、DOSPER (Boehringer #1811169) などが挙げられる。①としては例えばリン酸カルシウムを用いたトランスフェクション法が挙げられ、この方法によって細胞内に入ったDNAは貧食小胞に取り込まれるが、核内にも十分な量のDNAが入ることが知られている (Graham, F. L. and Van Der Eb, J., 1973, Virology 52: 456; Wigler, M. and Silverstein, S., 1977, Cell 11: 223)。ChenおよびOkayamaはトランスファー技術の最適化を検討し、1) 細胞と共沈殿物のインキュベーション条件を 2~4% CO<sub>2</sub>、35℃、15~24時間、2) DNAは直鎖状より環状のものが活性が高く、3) 沈殿混液中のDNA濃度が 20~30  $\mu$ g/mlのとき最適な沈殿が得られると報告している (Chen, C. and Okayama, H., 1987, Mol. Cell. Biol. 7: 2745)。②の方法は、一過的なトランスフェクションに適している。古くはDEAE-デキストラン (Sigma #D-9885 M. W.  $5 \times 10^5$ ) 混液を所望のDNA濃度比で調製し、トランスフェクションを行う方法が知られている。複合体の多くはエンドソームの中で分解されてしまうため、効果を高めるためにクロロキンを加えることもできる (Calos, M. P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015)。③の方法は電気穿孔法と呼ばれる方法で、細胞選択性がないという点で①や②の方法に比べて汎用性が高い。効率はパルス電流の持続時間、パルスの形、電界 (電極間のギャップ、電圧) の強さ、バッファの導電率、DNA濃度、細胞密度の最適条件下で良いとされている。

以上、3つのカテゴリーの中で②の方法は操作が簡便で多量の細胞を用いて多数の検体を検討することができるので、ベクター再構成のためのDNAの細胞への導

入には、トランスフェクション試薬が適している。好適には Superfect Transfection Reagent (QIAGEN, Cat No. 301305)、または DOSPER Liposomal Transfection Reagent (Boehringer Mannheim, Cat No. 1811169) が用いられるが、これらに制限されない。

cDNAからの再構成は具体的には次のようにして行うことができる。

24穴から6穴程度のプラスチックプレートまたは100mmペトリ皿上で、10%ウシ胎児血清(FCS)および抗生物質(100 units/ml ペニシリンGおよび100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン)を含む最少必須培地(MEM)を用いてサル腎臓由来細胞株LLC-MK2を70~80%コンフルエントになるまで培養し、例えば1  $\mu$ g/ml psoralen (ソラレン)存在下 UV照射処理を20分処理で不活化した、T7ポリメラーゼを発現する組換えワクシニアウイルスvTF7-3 (Fuerst, T. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8122-8126, 1986, Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996) を2 PFU/細胞で感染させる。ソラレンの添加量およびUV照射時間は適宜調整することができる。感染1時間後、2~60  $\mu$ g、より好ましくは3~5  $\mu$ gの上記の組換えセンダイウイルスcDNAを、全長センダイウイルスゲノムの生成に必須なトランスに作用するウイルスタンパク質を発現するプラスミド(24-0.5  $\mu$ gのpGEM-N、12-0.25  $\mu$ gのpGEM-P、および24-0.5  $\mu$ gのpGEM-L、より好ましくは例えば1  $\mu$ gのpGEM-N、0.5  $\mu$ gのpGEM-P、および1  $\mu$ gのpGEM-L) (Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996) と共にSuperfect (QIAGEN社)を用いたりポフェクション法等によりトランスフェクションする。トランスフェクションを行った細胞は、所望により100  $\mu$ g/mlのリファンピシン (Sigma) 及びシトシンアラビノシド (AraC)、より好ましくは40  $\mu$ g/mlのシトシンアラビノシド (AraC) (Sigma) のみを含む血清不含のMEMで培養し、ワクシニアウイルスによる細胞毒性を最少にとどめ、ウイルスの回収率を最大にするように薬剤の最適濃度を設定する (Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579)。トランスフェクションから48~72時間程度培養後、細胞を回収し、凍結融解を3回繰り返して細胞を破碎した後、LLC-MK2細胞にトラン

スフェクションして培養する。培養3～7日後に培養液を回収する。エンベロープ蛋白質をコードする遺伝子を欠損した複製能を持たないウイルスベクターを再構成させるには、エンベロープタンパク質を発現するLLC-MK2細胞をトランスフェクションに使用するか、またはエンベロープ発現プラスミドを共にトランスフェクションすればよい。また、トランスフェクションを行った細胞にエンベロープタンパク質を発現するLLC-MK2細胞に重層して培養することによって欠損型ウイルスベクターを増幅することもできる（国際公開番号 W000/70055 および W000/70070参照）。あるいは、上記の凍結融解による細胞破砕物を10日齢の発育鶏卵の尿膜内へ接種し、約3日後、尿液を回収してもよい。培養上清または尿液に含まれるウイルス力価は赤血球凝集活性(HA)を測定することにより決定することができる。HAは「endo-point 希釈法」(Kato, A. et al., 1996, *Genes Cells* 1: 569-579; Yonemitsu, Y. & Kaneda, Y., *Hemagglutinating virus of Japan-liposome-mediated gene delivery to vascular cells*. Ed. by Baker AH. *Molecular Biology of Vascular Diseases*. Method in Molecular Medicine: Humana Press: pp. 295-306, 1999) により決定することができる。混入し得るワクシニアウイルスvTF7-3を除去するために、得られた尿液試料を適宜希釈（例えば $10^6$  倍）して、鶏卵で再増幅させることができる。再増幅は、例えば3回上繰り返すことができる。得られたウイルスストックは $-80^{\circ}\text{C}$ で保存することができる。

回収したパラミクソウイルスは実質的に純粋になるよう精製することができる。精製方法はフィルトレーション、遠心分離、およびカラム精製等を含む公知の精製・分離方法またはその組み合わせにより行うことができる。「実質的に純粋」とは、単離した物質（化合物、ポリペプチド、またはウイルス等）が、それが存在する試料中の成分として主要な割合を占めることを言う。典型的には、試料中に存在する実質的に純粋な成分は、試料中の他の成分を合わせた全体の50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上を占める。割合は当業者に公知の手順により、例えば重量比率 [w/w] 等で算出され

る。溶媒、塩、添加化合物などは除外して算出する。パラミクソウイルスの具体的な精製方法としては、例えばセルロース硫酸エステルまたは架橋ポリサッカライド硫酸エステルを用いる方法（特公昭62-30752号公報、特公昭62-33879号公報、および特公昭62-30753号公報）、およびフコース硫酸含有多糖および/またはその分解物に吸着させる方法（W097/32010）等を例示することができる。

ウイルスベクターが再構成する限り、再構成に用いる宿主細胞は特に制限されない。例えば、LLCMK2細胞、サル腎由来のCV-1細胞、ハムスター腎由来のBHK細胞などの培養細胞、ヒト由来細胞等を使うことができる。また、大量にセンダイウイルスベクターを得るために、上記の宿主から得られたウイルスベクターを発育鶏卵に感染させ、該ベクターを増幅することができる。鶏卵を使ったウイルスベクターの製造方法は既に開発されている（中西ら編, (1993), 「神経科学研究の先端技術プロトコールIII, 分子神経細胞生理学」, 厚生社, 大阪, pp. 153-172)。具体的には、例えば、受精卵を培養器に入れ9～12日間 37～38℃で培養し、胚を成長させる。ウイルスベクターを尿膜腔へ接種し、数日間卵を培養してウイルスベクターを増殖させる。培養期間等の条件は、使用する組換えセンダイウイルスにより変わり得る。その後、ウイルスを含んだ尿液を回収する。尿液からのセンダイウイルスベクターの分離・精製は常法に従って行うことができる（田代真人, 「ウイルス実験プロトコール」, 永井、石浜監修, メジカルビュー社, pp. 68-73, (1995)）。

欠損型ウイルスベクターを調製する場合、例えば、ベクターに含まれるウイルスゲノム上で欠損しているエンベロープ遺伝子が異なる2種のベクターを同じ細胞に導入すれば、それぞれで欠損するエンベロープタンパク質が、もう一方のベクターからの発現により供給されるため、互いに相補しあって感染力のあるウイルス粒子が形成され、複製サイクルがまわりウイルスベクターが増幅される。すなわち、2種またはそれ以上の本発明のベクターを、エンベロープタンパク質を相補する組み合わせで接種すれば、それぞれのエンベロープ遺伝子欠損型ウイル

スペクターの混合物を大量かつ低コストで生産することができる。これらのウイルスは、エンベロープ遺伝子が欠損しているため、エンベロープ遺伝子を欠損していないウイルスに比べゲノムサイズが小さくなり長い外来遺伝子を保持することができる。また、元々感染性のないこれらのウイルスは細胞外で希釈され共感染の維持が困難であることから、不稔化するため、環境放出管理上の利点がある。

外来遺伝子として疾患の治療用遺伝子を用いてウイルスベクターを調製すれば、このベクターを投与して遺伝子治療を行うことが可能となる。本発明のウイルスベクターの遺伝子治療への応用としては、直接投与による遺伝子発現、間接（*ex vivo*）投与による遺伝子発現のいずれの方法によっても、治療効果を期待できる外来遺伝子もしくは患者の体内で供給が不足している内在遺伝子等を発現させることが可能である。外来遺伝子としては特に制限はなく、蛋白質をコードする核酸に加え、例えば、アンチセンスまたはリボザイムなどのタンパク質をコードしない核酸であってもよい。

本発明のパラミクソウイルスベクターは、薬学的に許容される所望の媒体と共に、腎細胞への遺伝子導入用の組成物とすることができる。「薬学的に許容される担体」とは、ベクターと共に投与することが可能であり、ベクターによる遺伝子導入を有意に阻害しない材料である。例えば本発明のパラミクソウイルスベクターを生理食塩水やリン酸緩衝生理食塩水（PBS）などで適宜希釈して組成物とすることができる。本発明のパラミクソウイルスベクターを鶏卵で増殖させた場合等においては尿液を含んでもよい。また本発明のパラミクソウイルスベクターを含む組成物は、脱イオン水、5%デキストロース水溶液等の担体または媒体を含んでもよい。さらに、その他にも、植物油、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、殺生物剤等が含有されていてもよい。また保存剤やその他の添加剤を添加することができる。

上記のようにして得られたパラミクソウイルスベクターまたは該ベクターを含

む組成物を腎細胞に接触させることで、パライクソウイルスベクターが持つ外来遺伝子を腎細胞へ導入することができる。本発明は、腎細胞へ遺伝子を導入するための、パライクソウイルスベクターの使用を提供する。感染経路は特に制限はなく、例えば静脈注射などにより全身に投与してもよく、あるいはベクターをより局所的に投与してベクターの導入範囲を制限することもできる。腎への局所投与には、腎血管内、尿管内、腎盂内、および腎実質内への投与などが挙げられる。具体的には腎動脈または腎静脈からの注入、あるいは尿管または腎盂からの逆行などが好適である (Tomita, N. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186: 129-134, 1992; Isaka, Y. et al., *J. Clin. Invest.* 92: 2597-2601; Arai, M. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206: 525-532, 1995; Heikkila, P. et al., *Gene Ther.* 3: 21-27, 1996; Rappaport, J. et al., *Kidney Int.* 47: 1462-1469, 1995; Oberbauer, R. et al., *Kidney Int.* 48: 1226-1232, 1995; Haller, H. et al., *Kidney Int.* 50: 473-480, 1996; Lien, Y. et al., *Exp. Nephrol.* 5: 132-136; Moullier, P. et al., *Kidney Int.* 45: 1220-1225, 1994; Bosch, R. et al., *Exp. Nephrol.* 1: 49-54, 1993; Zhu, G. et al., *Gene Ther.* 3: 298-304)。特に、血管を介してベクターを注入した場合は間質細胞および糸球体に効率よく遺伝子が導入され、これらの細胞の近傍にはマクロファージの浸潤も見られないことから好ましい。

血管から注入する場合、例えば、対象となる遺伝子を含むベクターを、カテーテルを介して動脈注射 (米国特許第5, 328, 470号参照) したり、または翼付注入セット (Terumo Medical Corporation) により注入することができる。注入に際しては、クランプ等により血流を遮断することが好ましい。例えば、カテーテルを左腎動脈に挿入し、腹部大動脈近傍をクランプで留めて血流を遮断し、生食で灌流後ベクター溶液を注入し遺伝子を導入することで左腎の細胞に遺伝子を導入することができる。

このような方法は、(a) 腎血管の血流を遮断する工程、(b) 腎血管内に、本

発明のパラミクソウイルスベクターを注入する工程、および(c)該ベクターが感染するようにインキュベートする工程を含む。遮断する血流は、例えば腎動脈の血流である。動脈を遮断してベクターを注入後、さらに静脈を遮断してインキュベートすることが好ましい。

具体的には、例えば、腎臓への血流を、上腸間膜動脈直下と下腸間膜動脈上方の大動脈をクランプすることで遮断することができる。このようにして左右片方の腎臓の血流だけを遮断することができる。生食で灌流後、適当なゲージの針により腎大動脈から本発明のベクターを直接注入することができる。短時間のインキュベーションによりベクターを感染させた後、クランプを取り除き血流を回復させる。

また、総頸動脈及び胸部大動脈から腎動脈近位にカテーテル挿入し、ここからベクターを注入することもできる (Tomita, N. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 186: 129-134, 1992)。この場合、例えば腹部大動脈のクリップにより腎動脈の遠位で血流を遮断し、生食で灌流後カテーテルからベクター溶液を注入する。これら以外でも、公知の方法により血管を介してベクターを注入してもよい。

尿管から逆行させてベクターを導入する場合、尿管からシリンジまたはカテーテルを挿入してベクター溶液を注入することができる。注入の際に、血管をクランプなどで遮断することもできる。この方法は、(a)腎血管の血流を遮断する工程、(b)尿管内に、本発明のパラミクソウイルスベクターを導入する工程、および(c)該ベクターが感染するようにインキュベートする工程を含む。例えば左腎静脈をクランプで遮断した後、ベクターを注入することができる。尿管からカテーテルを挿入すれば、腎盂手前または腎盂内などにベクター溶液を注入することができる。

ベクターを感染させるためのインキュベーションは、例えば数分(約1分~約10分程度)行うことができる。血流を遮断する場合、約10分を超えると虚血性の組

組織損傷が生じる恐れがあることから、十分な感染効率が得られる限り、なるべく短時間で血流を再開させることが好ましい。組織損傷を低減するため、長時間血流を遮断する場合は組織を氷などで冷やすことが好ましい。

さらに、ウイルスベクターに生体適合性のポリオル（例えば poloxamer 407など）を組み合わせることで、ウイルスベクターの形質導入率を10～100倍に上昇させ得る（March et al., Human Gene Therapy 6: 41-53, 1995）。これによりウイルスベクターの投与量を低く抑え、また感染時間を短縮することができる。本発明においては、生体適合性のポリオルを、本発明のパラミクソウイルスベクターと組み合わせて組成物とすることができる。また、別の生体適合性ポリオルを組み合わせ用いてもよい。また、血圧を上昇または下降させる種々の薬剤を組み合わせ投与することも可能である。上記の薬剤は、ベクターと一緒に投与することもできれば、別々に投与することもできる。

さらに本発明の方法を用いて生体外（ex vivo）で腎細胞に遺伝子を導入することもできる（Kitamura, M. et al., J. Clin. Invest. 94: 497-505; Kitamura, M. et al., Kidney Int. 51: 1274-1279, 1997; Naito, T. et al., Mol. Med. 2: 297-312, 1996; Koseki, C. et al., Am. J. Physiol. 261: C550-C554, 1994; Heikkila, P. et al., Gene Ther. 3: 21-27, 1996; Zeigler, S. et al., Transplantation 61: 812-817, 1996）。例えば、移植においてドナーから腎臓を回収し、この腎臓に対して本発明のベクターを投与する。また、腎臓から腎細胞を回収し、これらの細胞に遺伝子を導入後、患者体内に注入することもできる。このような細胞としては、例えばメサングウム細胞、マクロファージ、尿細管上皮細胞などが挙げられる。具体的には、例えば、バイオペシーにより患者腎臓よりメサングウム細胞を採取し、遺伝子導入後に患者腎臓に戻すことが考えられる。このようなメサングウム細胞への遺伝子導入のために、本発明のベクターを用いることが可能である。また、尿細管上皮細胞に遺伝子を導入し、被膜下に移植して間質へのex vivoによるトランスフェクションを行うこともできる。



本発明のパラミクソウイルスベクターを利用した遺伝子導入の標的となる腎細胞としては、特に制限はないが、例えば、間質、糸球体、血管（動脈、静脈、および毛細管を含む）、尿細管（遠位尿細管および近位尿細管を含む）など細胞が挙げられる。具体的には、間質性線維芽細胞、メサングウム細胞、血管内皮細胞、尿細管上皮細胞（TEC）、マクロファージなどが好適な標的細胞である。また、成体および胚（胎児）の腎細胞（後腎、中腎、前腎の細胞を含む）が対象となる。また、間葉系細胞などの腎始原細胞に遺伝子を導入することもできる。

本発明のパラミクソウイルスにより導入する遺伝子としては、特に制限はないが、天然の蛋白質としては、例えばホルモン、サイトカイン、増殖因子、受容体、酵素、ペプチドなどが挙げられる。蛋白質は分泌蛋白質、膜蛋白質、細胞質蛋白質、核蛋白質などであり得る。人工的な蛋白質としては、例えば、キメラ毒素などの融合蛋白質、ドミナントネガティブ蛋白質（受容体の可溶性分子または膜結合型ドミナントネガティブ受容体を含む）、欠失型の細胞接着分子および細胞表面分子などが挙げられる。また、分泌シグナルや膜局在化シグナル、核移行シグナル等を付加した蛋白質であってもよい。導入遺伝子は、腎細胞で発現していない遺伝子であってもよく、また腎細胞で発現している遺伝子を導入し、発現を増大させてもよい。また、アンチセンスRNA分子またはRNA切断型リボザイムなどを発現させて腎細胞で発現する望ましくない遺伝子の機能を抑制することもできる。

本発明のベクターは、様々な腎疾患に対する遺伝子治療に適用することが期待される。このような遺伝子治療には、例えば、遺伝子欠損による細胞での発現の異常を補正するために、また、外来遺伝子を細胞に導入することにより新しい機能を付加させるために、あるいは、ある遺伝子に対して抑制的に働く遺伝子を導入することにより細胞における望ましくない作用を抑制するために行い得る。また、本発明のベクターは非ヒト哺乳動物の腎細胞への遺伝子導入にも有用である。例えば、様々な疾患モデルの作製や、疾患モデルおよび腎移植等における治療

方法の開発または評価において有用である。

本発明は、例えば腎移植において適用することが考えられる。腎同種移植または異種移植などにおいて、本発明のベクターを用いて移植組織に外来遺伝子を導入することが可能である。例えば拒絶反応を抑制する遺伝子を発現させ、移植後の急性拒絶反応を抑制することが考えられる（例えばZeigler, S. et al., Transplantation 61: 812-817, 1996参照）。また、上述のようにマクロファージ、あるいはメサンギウム細胞または内皮細胞などの腎細胞を単離し、これに外来遺伝子を導入して腎臓へ移入することもできる。メサンギウム細胞を使った移植による投与は、例えば公知のメサンギウム細胞ベクター系を利用することができる（Kitamura, M. et al., J. Clin. Invest. 94: 497-505, 1994; Kitamura, M. Exp. Nephrol. 5: 118-125, 1997）。この方法では、メサンギウム細胞は糸球体毛細管に捕捉され外来遺伝子を発現する。また、マクロファージベクターなどを用いてもよい（Kitamura, M. et al., Kidney Int. 51: 1274-1279）。例えば、炎症を起した糸球体に対して各種サイトカイン、免疫抑制蛋白質、または抗線維蛋白質などの遺伝子を導入することが考えられる。

本発明は、腎臓における癌の治療にも適用され得る。動脈カテーテルなどを介して癌治療のための遺伝子を癌病巣に導入することが考えられる。用いられる遺伝子としてはサイトカイン、可溶性VEGF受容体等の血管新生を阻害する蛋白質などが挙げられる。

また、本発明のベクターは、急性尿細管壊死（acute tubular necrosis）に対して酸化窒素合成酵素（NOS）の導入、または細胞内接着分子-1（ICAM-1）の機能を阻害する遺伝子の導入などに用いることが考えられる。また、血管形成術後の腎動脈狭窄症の予防、腎嚢胞の治療等に本発明のベクターを用いることもできる。

その他の適用可能な疾患としては、上気道などの細菌感染によって起こる急性糸球体腎炎（acute glomerulonephritis; AGN）、急速進行性糸球体腎炎（rapidly

progressive glomerulonephritis; RPGN)、慢性糸球体腎炎 (chronic glomerulonephritis; CGN) [微小変化型 (minimal change)、巣状糸球体硬化症 (focal glomerular sclerosis)、膜性腎症 (membranous nephropathy)、メサンギウム増殖性腎症 (mesangial proliferative glomerulonephritis)、膜性増殖性糸球体腎症 (membranoproliferative glomerulonephritis)、硬化性糸球体腎炎 (sclerosing glomerulonephritis) を含む]、糖尿病や肝炎などに伴い二次的に糸球体が侵される二次性糸球体疾患 (secondary glomerular disease)、ネフローゼ症候群 (nephrotic syndrome) などが挙げられる。また、管内増殖性腎症、半月体形成性腎炎等への適用などが挙げられる。また、HIV等の感染による腎障害の予防および治療に適用することも考えられる。

さらに、本発明のベクターによる腎細胞を標的とした治療の対象となりうる疾患または傷害とその治療用遺伝子候補の具体例としては、以下のようなものが挙げられる。

1. 慢性糸球体腎炎    hepatocyte growth factor (HGF), Smad 6/7  
                         dominant negative TGF- $\beta$  receptor
2. 糖尿病性腎症    hepatocyte growth factor (HGF), Smad 6/7  
                         dominant negative TGF- $\beta$  receptor
3. 糸球体硬化症    hepatocyte growth factor (HGF), Smad 6/7  
                         dominant negative TGF- $\beta$  receptor
4. アルポート症候群    type IV collagen
5. 尿細管間質性腎炎    hepatocyte growth factor (HGF), Smad 6/7  
                         dominant negative TGF- $\beta$  receptor

TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) は多機能サイトカインであり、組織回転や損傷回復などにおいて重要な機能を果たしている。TGF- $\beta$  は特に細胞外マトリクス (ECM) の蓄積を誘導する機能を有しており、またインテグリン等のECM受容体の発現も調節する。糖尿病性腎症などを含む様々な進行性腎疾患において

共通する現象に、糸球体のECM蓄積が挙げられる。このことから、TGF- $\beta$ の発現または機能を阻害することにより、ECMの蓄積を抑制することが可能である。

例えば、小分子デルマタン硫酸プロテオグリカンの1つである decorin は、TGF- $\beta$ に対する天然の阻害因子である。この遺伝子 (decorin cDNA) の導入により、糸球体のECMの蓄積が低減される (Isaka, Y. et al., Nat. Med. 2: 418-423, 1996)。

また、TGF- $\beta$ 受容体の細胞外ドメインを持つ分子は、TGF- $\beta$ を中和してTGF- $\beta$ の機能発現を阻害する。TGF- $\beta$ 受容体にはI型とII型が存在し、II型受容体にTGF- $\beta$ が結合し、これがI型受容体と相互作用する。TGF- $\beta$ の抑制に用いる受容体断片としては、I型およびII型のどちらでもよいが、TGF- $\beta$ と直接相互作用するII型受容体断片を用いることが好ましい。シグナル伝達機能を欠損させた不活性化型TGF- $\beta$ 受容体を発現させることで、TGF- $\beta$ を中和することができる。単に可溶性受容体を発現させるだけでも一定の効果は得られる (Lin, H. Y. et al., J. Biol. Chem. 270: 2747-2754, 1995) が、例えばTGF- $\beta$ 受容体の細胞外ドメインをIgG-Fcと融合させた分子 (例えばTGF-RII/Fc) (Isaka, Y. et al., Kidney Int. 55: 465-475, 1999; Isaka, Y. et al., J. Am. Soc. Nephrol. 7: 1735, 1996) を発現させれば、効果を有意に増強させることが可能である。この分子を腎細胞に発現させることで、糸球体における細胞外マトリクスの蓄積を抑制することができる。また、PDGF (platelet-derived growth factor) の細胞外ドメインを同様にFcとの融合蛋白質として導入することも考えられる (Imai, R. and Y. Isaka, Nephron 83: 296-300, 1999; Isaka et al., Kidney Int. 52: Suppl. S100-S103, 1997)。アンチセンスRNA分子またはRNA切断型リボザイムなどにより、これらの遺伝子の発現を抑制することも考えられる。逆に急性糸球体損傷などにおいては、TGF- $\beta$ 遺伝子の導入が効果を有する可能性がある。また、腎疾患モデルの作製にTGF- $\beta$ 遺伝子を用いることもできる。

SmadはTGF- $\beta$ のシグナルを伝達するシグナル分子のファミリーであり、この遺

伝子ファミリーの機能も遺伝子導入による制御の対象となる。特に、TGF- $\beta$  シグナルを抑制的に調節する抑制型Smad遺伝子の導入は、TGF- $\beta$  の作用を抑制するために好適である。このような分子としてはSmad6およびSmad7が挙げられる。

HGF (hepatocyte growth factor) は間葉系細胞で産生される増殖因子であり、肝臓および腎臓を含む臓器の内皮細胞や上皮細胞の細胞増殖を調節している。またHGFは形態形成を誘導し、分枝した尿細管を形成させる。また、虚血や薬剤による組織損傷により引き起こされる急性腎不全を予防する (Kawaida, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 4357-61, 1994)。HGFによる腎疾患マウスの治療も試みられている (Mizuno, S. et al., J. Clin. Invest. 101: 1827-34, 1998)。このように、HGFは腎細胞を標的とする遺伝子治療における導入遺伝子として重要である (Imai, R. and Y. Isaka, Nephron 83: 296-300, 1999)。HGFは腎疾患における進行性の線維化を予防するためにも有用である。

15-リポキシゲナーゼ (15-Lipoxygenase; 15-LO) はロイコトリエンの炎症作用をアンタゴナイズする 15-S-hydroxyeicosatetraenoic acidおよびlipoxin A<sub>4</sub>の合成を媒介する酵素である。糸球体腎症モデルにおいて、15-LO遺伝子の導入が効果を有するという報告があり (Yura, T. et al., J. Am. Soc. Nephrol. 6: 890, 1995; Imai, E. et al., Exp. Nephrol. 5: 112-117, 1995; Munger, K. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 13375-13380, 1999)、この遺伝子も治療遺伝子として有効である。

また、腎細胞を標的とした遺伝子導入 (例えば、遺伝子治療) において特に有用な外来遺伝子としては、以下のようなものが挙げられる。

- 1) 細胞周期抑制遺伝子 (例えばp53、p21、p16、p27など)
- 2) 細胞内増殖シグナル抑制因子遺伝子 (例えば、変異型H-Rasなど)
- 3) 分泌型細胞増殖抑制因子遺伝子 (例えば、eNOS、CNP:C型ナトリウム利尿ペプチドなど)
- 4) 血管平滑筋細胞弛緩因子遺伝子 (例えば、eNOS、CNPなど)

- 5) 血管平滑筋細胞弛緩イオンチャンネル遺伝子 (例えば、C末欠損型Kir 6.2カリウムイオンチャンネルなど)
- 6) 血栓溶解蛋白遺伝子 (例えば組織プラスミノゲン・アクチベーター、ウロキナーゼなど)
- 7) 組織因子反応経路阻害因子遺伝子 (TFPI : Tissue Factor Pathway Inhibitor など)
- 8) 血管新生因子遺伝子 (例えば VEGF、FGF、HGFなど)
- 9) スーパーオキシドディスムターゼ (SOD, 超酸化物不均化酵素) (例えばCu/Zn型SOD、Mn型SOD、EC-SODなどを含む)

本発明のベクターは、腎間質細胞に高い効率で遺伝子を導入できることが特徴の一つである。この性質を利用して、様々な腎疾患に対する遺伝子治療が可能になるものと期待される。ヒトにおける進行性の腎疾患は、最終的には共通して尿細管間質性線維症 (tubulointerstitial fibrosis) を発症する。持続性の炎症や間質で繰り返される傷害が次第に腎組織を破壊し、その結果、多くの場合において腎機能の深刻な機能低下が引き起こされる (Schainuck, L. I. et al., Hum. Pathol. 1: 631-641, 1970; Bohle, A. et al., Virchows Arch. 376: 211-232; Bohle, A. et al., Virchows Arch. 373: 15-22, 1977; Mackensen, S. et al., Nephron 24: 30-34, 1979)。また、間質性線維症は、糸球体または血管の傷害により二次的に引き起こされることもあり得る。腎疾患の進行が腎不全の最終場面に至る機構の詳細は知られていないが、幾つかの研究では、糸球体の損傷ではなく尿細管間質の傷害の程度が、腎機能障害および長期的な予後の程度と正確に相関し得ることが報告されている (Risdon, R. A. et al., Lancet 2: 363-366, 1968; Schainuck, L. et al., Hum. Pathol. 1: 631-641, 1970)。

間質性線維症の過程は、細胞成分および細胞外マトリクスの代謝回転で働く正常な調節が異常に引き伸ばされたものと見ることができる。間質性線維芽細胞は、いわゆる筋線維芽細胞と呼ばれる合成表現型を獲得し、増殖して活発な炎症が

起こるレジデント領域 (residential areas) に浸潤する (Alpers, C. et al., J. Am. Soc. Nephrol. 5: 201-210, 1994)。その後、これらの細胞は細胞外マトリクスの合成を引き起こし、局所的な線維形成を促進する。従って、間質性線維芽細胞を標的とする遺伝子導入技術により、インビボ (in vivo) での間質における特定分子の効果を検証することが可能となる。さらに、この技術は間質性線維症の治療法の開発にとっても重要である。

遺伝子治療は、腎器官内または外から、パラミクソウイルスベクター含有組成物をインビボ (in vivo) で投与し、外来遺伝子を腎細胞内で発現させることにより実施することができる。また、エキスビボ (ex vivo) による投与を行ってもよい。インビボ (in vivo) による遺伝子導入は例えば、腎動脈または腎静脈へのベクター注入、腎臓への直接注入、尿管からの逆行、腎盂からの逆行等の局所投与により行うことができる。その他に、例えば、全身または他の器官への投与を介して間接的に腎細胞に投与することもできる。エキスビボ (ex vivo) による遺伝子導入は、例えば、摘出した腎臓に対して、腎動脈または腎静脈へのベクター注入、腎臓への直接注入、尿管からの逆行、腎盂からの逆行等により投与することができる。あるいは、臓器等から腎細胞を調製し、本発明のベクターとインキュベートすることにより遺伝子を導入することもできる。遺伝子が導入された腎細胞は、例えば腎臓へ再移入することができる。

治療および予防において腎細胞への遺伝子導入用パラミクソウイルスベクターは、有効量のベクターが腎細胞に導入されるのに十分な量を投与される。「有効量」とは、本発明に方法において、所望の治療または予防効果を少なくとも部分的にもたらすように腎細胞に遺伝子が導入される量を言う。所望の遺伝子を含む本発明のパラミクソウイルスベクターの有効量が投与されることにより、ベクターが導入された細胞において導入遺伝子産物が産生され、それに伴って該細胞および/またはその周囲の腎細胞の表現型の変化(すなわち導入遺伝子およびその他の遺伝子の発現誘導または抑制、並びに形態学的、生化学的変化など)が誘導され

る。好ましくは、所望の遺伝子を有する本発明のベクターの有効量が投与されることにより、投与された腎臓中の有意な数の細胞に遺伝子が導入され、該細胞の表現型の変化が誘導される。「有意な数の細胞」とは、本発明のベクターが、投与部位における標的腎細胞の少なくとも約0.1%、好ましくは約1%以上、より好ましくは約5%以上、より好ましくは約10%以上、最も好ましくは約20%以上の細胞で遺伝子が導入されることを言う。標的腎細胞としては、例えば、間質細胞、糸球体細胞、または尿細管細胞、あるいはメサングウム細胞、上皮細胞、内皮細胞等が挙げられる。

細胞への遺伝子導入は、当業者に公知の方法によりアッセイすることが可能である。遺伝子の転写産物は、例えば、ノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCR、RNAプロテクションアッセイ等により検出・定量することができる。ノーザンハイブリダイゼーションやRT-PCR等による検出は *in situ* でも行い得る。また、翻訳産物を検出するには、抗体を用いたウェスタンブロット、免疫沈降、RIA、ELISA、プルダウンアッセイ等により行うことができる。また、遺伝子導入の検出を容易にするため、発現させる蛋白質にタグを付加したり、レポーター遺伝子を発現するように組み込んでおくことも可能である。レポーター遺伝子は、 $\beta$ ガラクトシダーゼ、CAT、アルカリホスファターゼ、またはGFPをコードする遺伝子等が挙げられるがこれらに制限されない。

ベクターの投与量は、疾患、患者の体重、年齢、性別、症状、投与目的、導入遺伝子、投与組成物の形態、投与方法等により異なるが、当業者であれば適宜決定することが可能である。好ましくは、投与するベクター量は約 $10^5$  pfu/mlから約 $10^{11}$  pfu/mlの範囲内であるとよい。より好ましくは、投与するベクターの量は約 $10^7$  pfu/mlから約 $10^9$  pfu/mlの範囲内であるとよい。最も好ましくは、約 $1 \times 10^8$  pfu/mlから約 $5 \times 10^8$  pfu/mlの範囲内の量を薬学上容認可能な担体中で投与することが好ましい。

本発明のウイルス含有組成物の投与対象としては、ヒト、サル、マウス、ラッ



ト、ウサギ、ヒツジ、ウシ、イヌなど全ての哺乳動物が含まれる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、腎動脈からSeV/GFPを投与して4日目のラット腎臓を回収し、前頭断にして蛍光実体顕微鏡下で観察した結果を示す写真である。皮質部から髄質部の広範囲にかけて強い蛍光が認められる。

図2は、尿管からSeV/GFPを投与して4日目のラット腎臓を回収し、前頭断にして蛍光実体顕微鏡下で観察した結果を示す写真である。皮質部から髄質部の広範囲にかけて強い蛍光が認められる。

図3は、腎動脈からSeV/GFPを投与して4日目の腎組織切片をGFPに対する抗体で染色した結果を示す写真である。陽性シグナルが瀰漫性に間質の線維芽細胞に観察される。下段に各組織を表記した。

図4は、尿管からSeV/GFPを投与して4日目の腎組織切片をGFPに対する抗体で染色した結果を示す写真である。陽性シグナルが瀰漫性に間質の線維芽細胞に観察される。下段に各組織を表記した。

図5は、腎動脈からSeV/GFPを投与して4日目の腎組織切片をGFPに対する抗体で染色した結果を示す写真である。GFP抗体陽性像が糸球体にも認められ、およそ20%の糸球体に感染していた。下段に糸球体を表記した。浸潤細胞は斜線で示した。

図6は、尿管からSeV/GFPを投与して4日目の腎組織切片をGFPに対する抗体で染色した結果を示す写真である。陽性シグナルが散在性に尿細管の上皮細胞で観察された。また、マクロファージの浸潤が認められた。下段に各組織・細胞を表記した。浸潤細胞は斜線で示した。

図7は、腎動脈からSeV/GFPを投与して7日目の腎組織切片をGFPに対する抗体で染色した結果を示す写真である。糸球体のGFP抗体陽性像が観察される。

図8は、腎動脈からSeV/GFPを投与して7日目の腎組織切片をGFPに対する抗体

で染色した結果を示す写真である。間質細胞および糸球体のGFP抗体陽性像が観察される。

図9は、腎動脈からSeV/GFPを投与して7日目の腎組織切片をGFPに対する抗体で染色した結果を示す写真である。GFP抗体陽性像が観察される。

図10は、腎動脈からSeV/GFPを投与して14日目の腎組織切片をGFPに対する抗体で染色した結果を示す写真である。

図11は、腎動脈からSeV/GFPを投与して14日目の腎組織切片をGFPに対する抗体で染色した結果を示す写真である。

図12は、腎動脈からSeV/GFPを投与して14日目の腎組織切片をGFPに対する抗体で染色した結果を示す写真である。

図13は、腎動脈からSeV/GFPを投与して14日目の腎組織切片をGFPに対する抗体で染色した結果を示す写真である。

図14は、腎動脈からSeV/GFPを投与して28日目の腎組織切片をGFPに対する抗体で染色した結果を示す写真である。

図15は、腎動脈からSeV/GFPを投与して28日目の腎組織切片をGFPに対する抗体で染色した結果を示す写真である。

#### 発明を実施するための最良の形態

実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。なお、本明細書全体を通じて引用された文献（文献、特許、公開特許出願を含めて）の内容はすべて、本明細書に組み込まれる。

〔実施例1〕腎臓投与用のGFP遺伝子を有する組換えセンダイウイルスベクター（GFP/SeV）の構築と調製

GFP遺伝子を有する組換えセンダイウイルスベクター（GFP/SeV）は、Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587及びYu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466の記載を基本に以下のように構築した。

まず、GFP遺伝子のcDNA塩基配列（構造遺伝子長717bp）を含むDNA試料を用意した。DNA試料は、25ng/ $\mu$ l以上の濃度で電気泳動的に単一のプラスミドとした。この試料から所望の遺伝子断片を増幅回収するために、NotI制限酵素切断部位配列及び後述する転写終結配列（E）、介在配列（I）及び転写開始配列（S）配列とGFP遺伝子の一部の配列を含むプライマー対として、フォワード側合成DNA配列及びリバーズ側合成DNA配列（アンチセンス鎖）を作成した。

フォワード側合成DNA配列は5'側からACTTを選択し、その3'側にNotI認識部位gcggccgcを付加し、さらにその3'側にスペーサー配列を付加した。さらにその3'側に所望のcDNAの開始コドンATGからこれを含めてORFの25塩基相当の配列を付加した。

リバーズ側合成DNA配列は5'側からATCCを選択し、その3'側にNotI認識部位gcggccgcを付加し、さらにその3'側に長さを調節するための挿入断片のオリゴDNAを付加した。このオリゴDNAの長さは、NotI認識部位gcggccgcを含め、cDNAの相補鎖塩基配列と後述するセンダイウイルスに由来するセンダイウイルスゲノムのE I S塩基配列の合計が6の倍数になるように塩基数を設計した（いわゆる「6のルール(rule of six)」;Kolakofski, D. et al., J. Virol. 72:891-899, 1998, Calain, P. and Roux, L., J. Virol. 67:4822-4830, 1993)。さらに挿入断片の3'側にセンダイウイルスのS配列の相補鎖配列：5'-CTTTCACCCT-3'（配列番号：1）、I配列：5'-AAG-3'、E配列の相補鎖配列：5'-TTTTTCTTACTACGG-3'（配列番号：2）、さらにその3'側に目的のcDNA配列の終始コドンから逆に数えて25塩基相当の相補鎖配列を付加し、リバーズ側合成オリゴDNAの3'の末端とした。

PCRは、Ventポリメラーゼ（NEB）を用いて行い、増幅した目的断片はNotIで消化した後、プラスミドベクターpBluescriptのNotI部位に挿入した。得られたPCR産物の塩基配列をシーケンサーで確認し、正しい配列のプラスミドを選択した。

組換えセンダイウイルスゲノムcDNAは文献記載の方法に準じて構築した(Kato,

A. et al., EMBO J. 16: 578-598, 1997, Hasan, M. K. et al. J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997)。まず、NotI制限部位を有する18bpのスペーサー配列 (5'-(G)-CGGCCGCAGATCTTCACG-3') (配列番号: 3) を、クローニングされたセンダイウイルスゲノムcDNA (pSeV(+)) のリーダー配列とN-タンパク質をコードする配列の5'末端との間の隣接遺伝子座に挿入し、肝炎デルタウイルスのアンチゲノム鎖 (antigenomic strand) 由来の自己開裂リボザイム部位を含むプラスミド pSeV18<sup>b</sup>(+)を得た (Hasan, M. K. et al., 1997, J. General Virology 78: 2813-2820)。GFPをコードする上記DNAをNotIで切断し、センダイウイルスのゲノムcDNAプラスミド、pSeV18<sup>b</sup>(+)のNotI部位に挿入し、GFP遺伝子が組込まれた組換えセンダイウイルスcDNAを得た。

このようにして作製した組換えセンダイウイルスcDNAを試験管内または細胞内で転写させ、ウイルスを再構成させることによって、組換えウイルスベクターを以下のようにして得た。

6穴のプラスチックプレート上で、10%ウシ胎児血清(FCS)および抗生物質(100 units/ml ペニシリンG, および100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン)を含む最少必須培地(MEM)を用いてサル腎臓由来細胞株LLCMK2を70~80%コンフルエント( $1 \times 10^6$ 細胞)になるまで培養し、T7ポリメラーゼを発現するUV照射により不活化した組換えワクシニアウイルスvTF7-3 (Fuerst, T. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8122-8126, 1986, Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996)を2 PFU/細胞で感染させた。感染1時間後、3~5  $\mu$ gの組換えセンダイウイルスcDNAを、全長センダイウイルスゲノムの生成に必須なトランスに作用するウイルスタンパク質を発現するプラスミド (1  $\mu$ gのpGEM-N、0.5  $\mu$ gのpGEM-P、および1  $\mu$ gのpGEM-L) (Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996)と共にSuperfect (QIAGEN社)を用いたリポフェクション法によりトランスフェクションした。トランスフェクションを行った細胞は、100  $\mu$ g/mlのリファンピシン (Sigma) 及び40  $\mu$ g/mlのシトシンアラビノシド (AraC) (Sigma)のみを含む血清不含のMEMで培

養した。これら薬剤はワクシニアウイルスによる細胞毒性を最少にとどめ、ウイルスの回収率を最大にするよう最適濃度を設定した (Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579)。トランスフェクションから48時間後、細胞を回収し、凍結融解を3回繰り返して細胞を破碎した後、10日齢の発育鶏卵の尿膜内へ接種した。3日後、尿液を回収し、ウイルス力価は赤血球凝集活性(HA)を測定することにより決定した。HAは「endo-point 希釈法」(Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579; Yonemitsu, Y. & Kaneda, Y., Hemagglutinating virus of Japan-liposome-mediated gene delivery to vascular cells. Ed. by Baker AH. Molecular Biology of Vascular Diseases. Method in Molecular Medicine: Humana Press: pp. 295-306, 1999) により決定した。 $10^3 \sim 10^4$  pfu/ml以下であると予想されるワクシニアウイルスvTF7-3を除去するために、尿液試料を $10^6$  倍に希釈し鶏卵で再増幅した。本操作を3回上繰り返し、得られた尿液を腎臓投与試料溶液として4℃に保存した。HA値からウイルスタイターは $2 \times 10^9$  pfu/mlであると見積もられた。

## 【実施例2】 F欠失型センダイウイルスベクターの構築と調製

### <1> F欠失型センダイウイルスゲノムcDNAおよびF発現プラスミドの構築

センダイウイルス (SeV) 全長ゲノムcDNA、pSeV18<sup>+</sup>b(+) (Hasan, M. K. et al., 1997, J. General Virology 78: 2813-2820) (「pSeV18<sup>+</sup>b(+)」は「pSeV18<sup>+</sup>」ともいう) のcDNAをSphI/KpnIで消化してフラグメント(14673bp)を回収し、pUC18にクローニングしてプラスミドpUC18/KSとした。F欠損部位の構築はこのpUC18/KS上で行った。F遺伝子の欠損は、PCR-ライゲーション方法の組み合わせで行い、結果としてF遺伝子のORF (ATG-TGA=1698bp) を除いてatgcatgccggcagatga (配列番号: 4) で連結し、F欠失型SeVゲノムcDNA (pSeV18<sup>+</sup>/ΔF) を構築した。PCRは、Fの上流には、フォワードプライマー (5'-gttgagtactgcaagagc/配列番号: 5) およびリバースプライマー (5'-tttgccggcatgcatgtttccaaggggagagttttgcaacc/配列番号: 6) を用い、F遺伝子の下流にはフォワードプライマー (5'-

atgcatgccggcagatga／配列番号：7）およびリバースプライマー（5'-tggtgaatgagagaatcagc／配列番号：8）を用いて増幅を行い、PCR産物をEcoT22Iで連結した。このように得られたプラスミドをSacIとSalIで消化して、F欠損部位を含む領域の断片（4931bp）を回収してpUC18にクローニングし、pUC18/dFSSとした。このpUC18/dFSSをDraIIIで消化して、断片を回収してpSeV18<sup>+</sup>のF遺伝子を含む領域のDraIII断片と置き換え、ライゲーションしてプラスミドpSeV18<sup>+</sup>/ΔFを得た。

さらに、F欠失部位にEGFP遺伝子を搭載したcDNA（pSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFP）を構築するため、PCRにより、EGFP遺伝子の増幅を行った。EGFP遺伝子を6の倍数（Hausmann, S. et al., RNA 2, 1033-1045 (1996)）に合わせるため5'はNsiI-taildプライマー（5'-atgcatatggtgatgcggttttggcagctac：配列番号：9）、3'はNgoMIV-tailedプライマー（5'-Tgccggctattattacttgtacagctcgtc：配列番号：10）を用いてPCRを行った。PCR産物を制限酵素NsiIとNgoMIVで消化してゲルから断片を回収し、pUC18/dFSSのF欠失部位にあるNsiIとNgoMIVという制限酵素部位に連結し、シーケンスを確認した。ここから、EGFP遺伝子を含むDraIII断片を回収し、pSeV18<sup>+</sup>のF遺伝子を含む領域のDraIII断片と置き換え、ライゲーションしてプラスミドpSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFPを得た。

## <2> SeV-F蛋白を誘導発現するヘルパー細胞の作製

センダイウイルスのF遺伝子（SeV-F）を発現するCre/loxP誘導型発現プラスミドの構築はSeV-F遺伝子をPCRで増幅し、シーケンスを確認した後、Cre DNAリコンビナーゼにより遺伝子産物を誘導発現されるように設計されたプラスミドpCALNdlw（Arai, T. et al., J. Virol. 72, 1115-1121 (1998)）のユニークサイトSwaI部位に挿入し、プラスミドpCALNdlw/Fとした。

F欠損ゲノムから感染ウイルス粒子を回収するため、SeV-F蛋白を発現するヘルパー細胞株を樹立した。細胞はSeVの増殖によく用いられているサル腎臓由来細胞株LLC-MK2細胞を用いた。LLC-MK2細胞は、10%の熱処理した不活化ウシ胎児血清

(FBS)、ペニシリンGナトリウム 50単位/ml、およびストレプトマイシン 50  $\mu$ g/ml を添加したMEMで37°C、5% CO<sub>2</sub>で培養した。SeV-F遺伝子産物は細胞傷害性を有するため、Cre DNAリコンビナーゼによりF遺伝子産物を誘導発現されるように設計された上記プラスミドpCALNdLw/Fを、リン酸カルシウム法 (mammalian transfection kit (Stratagene)) により、そのプロトコールに従ってLLC-MK2細胞に遺伝子導入を行った。

10cmプレートを用い、40%コンフルエントまで生育したLLC-MK2細胞に10  $\mu$ gのプラスミドpCALNdLw/Fを導入後、10mlの10% FBSを含むMEM培地にて、37°Cの5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中で24時間培養した。24時間後に細胞をはがし、10ml培地に懸濁後、10cmシャーレ5枚を用い、5ml 1枚、2ml 2枚、0.2ml 2枚に蒔き、G418 (GIBCO-BRL) を1200  $\mu$ g/mlを含む10mlの10%FBSを含むMEM培地にて培養を行い、2日毎に培地交換しながら、14日間培養し、遺伝子の安定導入株の選択を行った。該培地により生育してきたG418に耐性を示す細胞はクローニングリングを用いて30株を回収した。各クローンは10cmプレートでコンフルエントになるまで拡大培養を続けた。

F蛋白質の発現誘導は、細胞を6cmシャーレにてコンフルエントまで生育させた後、アデノウイルスAxCANCreを斉藤らの方法 (Saito et al., Nucl. Acids Res. 23: 3816-3821 (1995); Arai, T. et al., J. Virol. 72, 1115-1121 (1998)) により moi=3 で感染させて行った。

### <3> F欠失SeVウイルスの再構築及び増幅

F欠損部位にenhanced green fluorescent protein(EGFP) 遺伝子をレポーターとして6nルールに従って導入した上記 pSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFP を下記のようにしてLLC-MK2細胞にトランスフェクションした。

LLC-MK2 細胞を5×10<sup>6</sup> cells/dish で 100mm ペトリ皿に蒔き、24時間培養後、ソラレンと長波長紫外線 (365nm) で 20 分間処理したT7 RNAポリメラーゼを発現するリコンビナントワクシニアウイルス (Fuerst, T. R. et al., Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 83, 8122-8126 (1986)) に室温で 1 時間感染させた (moi=2) (moi=2 ~3 が好ましく、より好適には moi=2 が用いられる)。ワクシニアウイルスへの紫外線照射には、15 ワットバルブを 5 本が装備された UV Stratakinker 2400 (カタログ番号 400676 (100V), ストラタジーン社, La Jolla, CA, USA) を用いた。細胞を 3 回洗浄してからプラスミド pSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFP, pGEM/NP, pGEM/P, 及び pGEM/L (Kato, A. et al., Genes cells 1, 569-579 (1996)) をそれぞれ 12 μg, 4 μg, 2 μg, 及び 4 μg /dish の量比で OptiMEM (GIBCO) に懸濁し、SuperFect transfection reagent (1 μg DNA/5 μl の SuperFect, QIAGEN) を入れて混合し、室温で 10 分間放置後、最終的に 3% FBS を含む OptiMEM 3ml に入れ、細胞に添加して培養した。3 時間培養後、細胞を、血清を含まない MEM で 2 回洗浄し、シトシン β-D-アラビノフラノシド 40 μg/ml (AraC, Sigma), トリプシン 7.5 μg/ml (GIBCO) を含む MEM で 70 時間培養した。これらの細胞を回収し、ペレットを OptiMEM に懸濁した (10<sup>7</sup> cells/ml)。凍結融解を 3 回繰り返して lipofection reagent DOSPER (Boehringer mannheim) と混合し (10<sup>6</sup> cells/25 μl DOSPER) 室温で 15 分放置した後、上記でクローニングした F 発現ヘルパー細胞の一つ LLC-MK2/F7 細胞にトランスフェクション (10<sup>6</sup> cells/well 12-well-plate) し、血清を含まない MEM (40 μg/ml AraC, 7.5 μg/ml トリプシンを含む) で培養し、上清を回収した。

### [実施例 3] センダイウイルスベクターの腎臓へのインビボ投与

#### (1) 腎動脈からのウイルス投与

6 週齢 Sprague Dawley (SD) ラット♂の体重 160~180g のものを用いた。動物は、ネンブタールを生食で 10 倍希釈し、体重の 1/100ml 容量を腹腔内に投与し麻酔した。正中切開により開腹し、左腎臓および腎動脈を、付着する脂肪組織等を除去後露出した。生理食塩水による灌流およびウイルス投与のために、24G カテーテルを左腎動脈に挿入した。さらに腹大動脈への逆流を防止するために、腹大動脈近傍をクランプで留めた。腎臓灌流を生理食塩水数百 μl を用いて行った。生食による灌流後、各々 300, 500, 700 μl (titer 2×10<sup>9</sup> pfu/ml) の実施例 1 で調製した



ウイルス試料溶液を、1mlシリンジを用いて投与した。カテーテルを取り外し、針痕はアロンアルファ（東亜合成化学）により閉傷した。5分間放置後、クランプを除去し、ミッヘル縫合びょうにより閉腹した。

## （2）尿管からのウイルス投与

6週齢Sprague Dawley (SD) ラット♂の体重160～180gの動物を用いた。動物は、ネンブタールを生食で10倍希釈し、体重の1/100ml容量を腹腔内に投与し麻酔した。正中切開後左部腎臓および尿管を露出した。26G針を尿管に挿入し、それぞれ300, 500, 700  $\mu$ l (titer  $2 \times 10^9$  pfu/ml) の実施例1で調製したウイルス (GFP/SeV) 試料溶液を腎臓に投与した。この際左腎静脈はクランプで閉塞した。5分間放置後、クランプは除去し、ミッヘル縫合びょうにより閉腹した。

## （3）腎臓試料の回収と切片作製

ウイルス投与4, 7, 14, 21, 28日後に腎臓試料の回収を行った。ラットをメンブタールにて麻酔、開腹した。腎臓灌流を行うために、腎動脈に分枝する腹大動脈の上部を止血鉗子で留め、腎動脈に分枝する腹大動脈の下部に翼状針を刺し、生理食塩水20ml導入し、除血後、腎臓を摘出した。摘出腎臓を前頭断に分割し、直前に調製したメタカルン溶液（メタノール：クロロホルム：酢酸＝9:6:1）にて固定した。固定試料を常法によりパラフィン包埋後、4  $\mu$ m厚のパラフィン切片を作製した。脱パラフィンはキシレンおよび順次希釈エタノールにより行った。

## （4）免疫組織染色

ウイルス感染組織の同定および細胞浸潤判定を行うために、抗GFP抗体（ラビットポリクローナル抗体、Molecular Probes, Oregon, USA）およびマクロファージに対する抗ED-1抗体（マウスモノクローナル抗体、Serotec, Oxford, England）による反応性を調べた。上述法により作製した切片を、内在性のperoxidaseの不活性化のためにメタノール：過酸化水素＝9:1溶液で室温5分間処理した。PBS溶液（10分間）で3回洗浄後、試料切片を20分間室温でブロッッキング処理した（ブロッッキング剤として以下の組み合わせを選択した：ラビット抗体には5%ヤギ血清、マ

ウスモノクローナル抗体には5%ウマ血清、各々200  $\mu$  l)。それぞれ50倍希釈した1次抗体処理を4°C、16時間行った。冷PBSで3回洗浄後、切片試料を2抗体反応に供した。2次抗体はGFP確認用としてビオチン化ヤギ抗ウサギIgG(H+L)抗体 (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) を150倍希釈し、マクロファージ確認用としてビオチン化ウマ抗マウスIgG(H+L) 抗体 (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) を150倍希釈して用いた。抗体反応は室温で30分間行い、冷PBS溶液 (10分間) で3回洗浄した。試料をアビジン-ビオチン化 (Vector社 アビジン-ビオチン化キットを用いて添付説明書に従って行った) したhorseradish peroxidase複合体と室温30分間放置した後、DAB溶液存在下で発色反応を行った。反応停止後、試料切片はメチルグリーンで共染色を行った。

#### (5) 投与4日後の腎臓生切片での蛍光顕微鏡によるGFP発現結果

投与GFP/SeVから発現したGFPを蛍光で確認するために、回収した生腎臓を前頭断にし、蛍光実体顕微鏡下で蛍光光源 (励起波長425nm、吸収波長480nm) 観察を行った。蛍光観察試料はすべて、腎動脈および尿管から500  $\mu$  lのウイルス投与4日後のものとした。図1 (腎動脈から投与したもの) および図2 (尿管から投与したもの) にその結果を示す。皮質部から髄質部の広範囲にかけて強い蛍光が認められることが確認出来る。

#### (6) 投与4日後の免疫組織染色結果

GFPに対する抗体反応の結果、腎動脈あるいは尿管からのどちらのウイルス投与においても、ウイルスは瀰漫性に間質の線維芽細胞に感染していた (図3および4)。腎動脈から投与の場合、GFP抗体陽性像が糸球体にも認められ、およそ20%の糸球体に感染していた (図5)。糸球体での抗体陽性細胞はメサングウム細胞と考察された。ここで注目すべき点は、腎動脈からの投与で観察されたGFP陽性糸球体および間質細胞付近において炎症性マクロファージの浸潤が認められないことである。尿管導入の場合には腎盂上皮細胞に強いGFPの発現が観察され、散在性に間質細胞、および尿細管の上皮細胞に感染が認められた (図6)。尿管からの投与

においては、尿細管細胞での発現は遠位尿細管のみならず、近位尿細管でも認められた。また、尿管からの投与においては尿細管周囲の組織中にかなりのマクロファージの浸潤が認められた。浸潤の誘導における投与経路によるこのような違いは、部分的には細尿管上皮細胞が抗原提示細胞としての能力を有することに起因する可能性がある。

#### (7) 投与7, 14, 21, 28日後の免疫組織染色結果

動物は、6週齢SDラットのみを用い、本実験はすべて腎動脈からの投与とした。投与ウイルス量はタイターが $2 \times 10^9$  pfu/mlのGFP/SeVを700  $\mu$ l/匹とした。免疫組織染色の結果、GFP抗体陽性像が投与全期間で観察された(7日, 図7～9; 14日, 図10～13)。感染が確認された間質細胞および糸球体細胞付近には、ほとんどマクロファージの浸潤が認められなかった。この投与実験において、腎動脈投与4日後には認められなかった尿細管の上皮細胞で、全期間にわたりGFP抗体陽性像が認められた(28日, 図14および15)。投与28日後においては、GFP抗体陽性尿細管細胞近傍に浸潤細胞が観察される場合が認められ、尿細管間質障害の徴候が示唆された。

#### 産業上の利用の可能性

腎細胞への遺伝子導入においては従来のベクターでは十分な遺伝子導入効率が得られなかったが、本発明により、パラミクソウイルスベクターを利用して短時間のベクターの露出で極めて高い効率で腎細胞へ遺伝子を導入することが可能となった。これにより、腎細胞を標的とした遺伝子治療のための基盤技術が提供された。

## 請求の範囲

1. パラミクソウイルスベクターを腎細胞に接触させる工程を含む、腎細胞へ遺伝子を導入する方法。
2. パラミクソウイルスベクターを血管内に投与する工程を含む、請求項1に記載の方法。
3. 血管が腎動脈である、請求項2に記載の方法。
4. パラミクソウイルスベクターを尿管内に投与する工程を含む、請求項1に記載の方法。
5. 腎細胞が間質細胞、糸球体細胞、および尿細管細胞からなる群より選択される細胞である、請求項1から4のいずれかに記載の方法。
6. パラミクソウイルスがセンダイウイルスである、請求項1から5のいずれかに記載の方法。
7. 腎細胞へ遺伝子を導入するために用いる、パラミクソウイルスベクター。
8. パラミクソウイルスベクターまたは該ベクターを含む細胞を含む、腎細胞への遺伝子導入用組成物。
9. 血管内に投与するために用いられる、請求項8に記載の組成物。
10. 血管が腎動脈である、請求項9に記載の組成物。
11. 尿管内に投与するために用いられる、請求項8に記載の組成物。
12. 腎細胞が間質細胞、糸球体細胞、および尿細管細胞からなる群より選択される細胞である、請求項8から11のいずれかに記載の組成物。
13. パラミクソウイルスがセンダイウイルスである、請求項8から12のいずれかに記載の組成物。

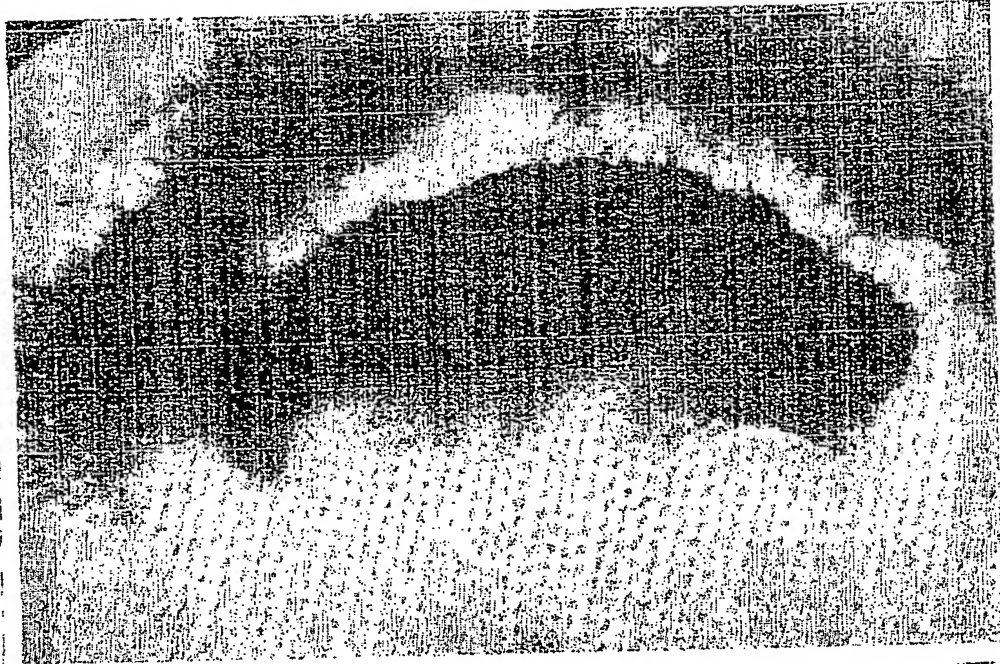
1 / 15

☒ 1



2 / 15

図 2



3 / 15

図 3

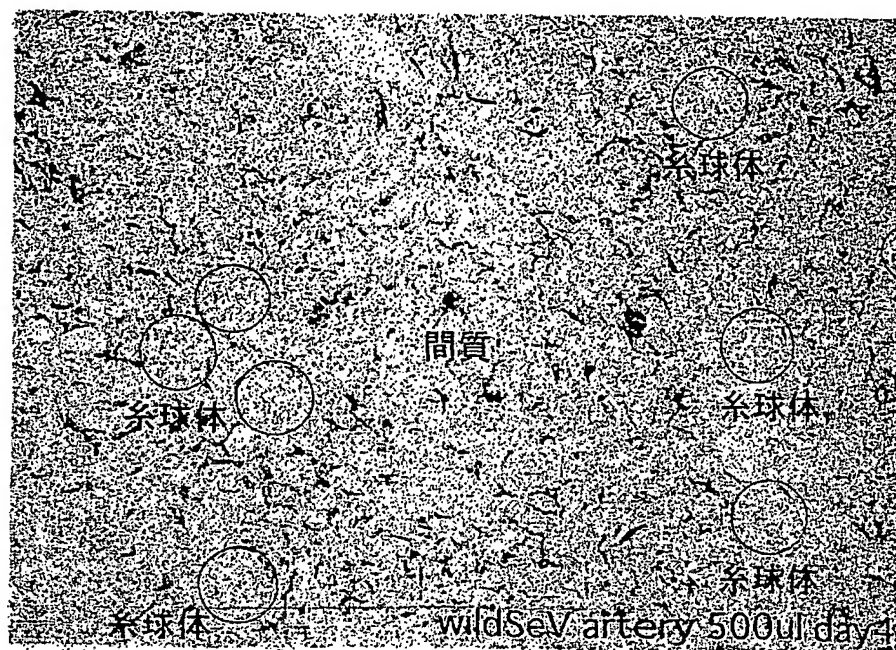
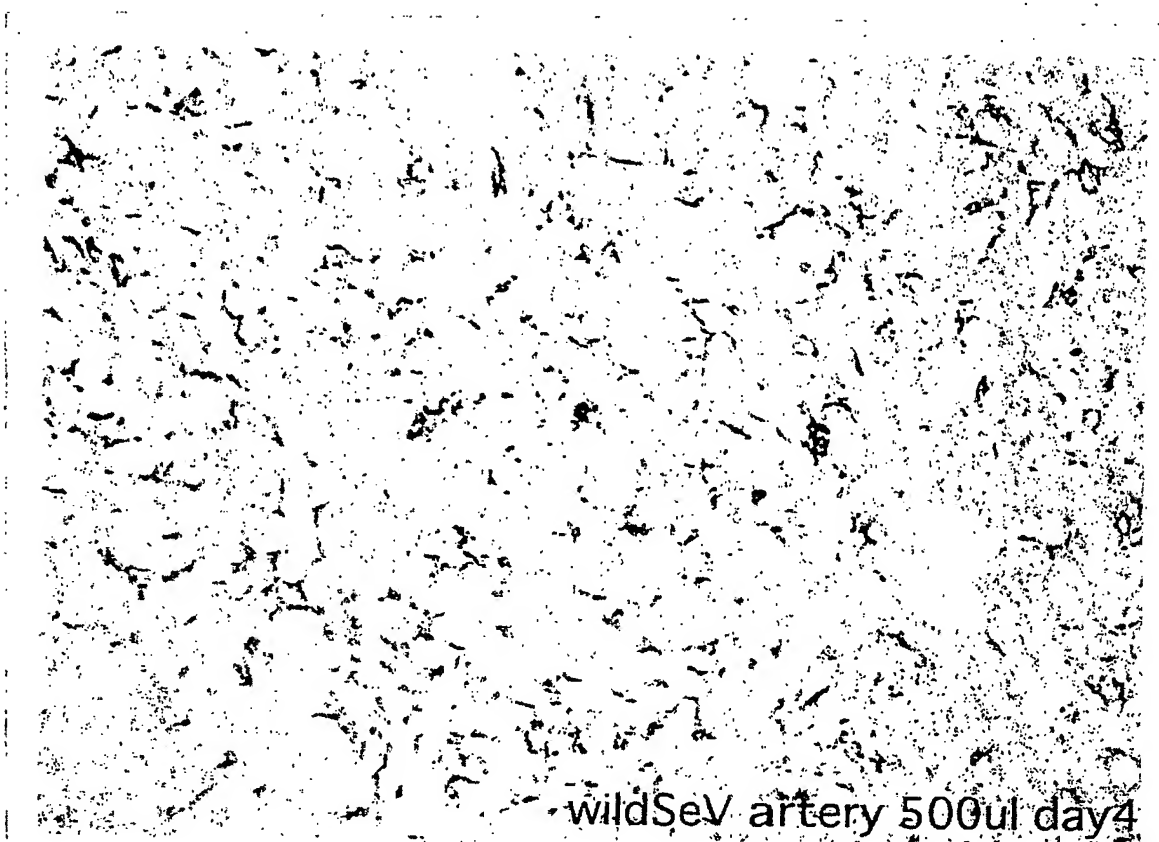
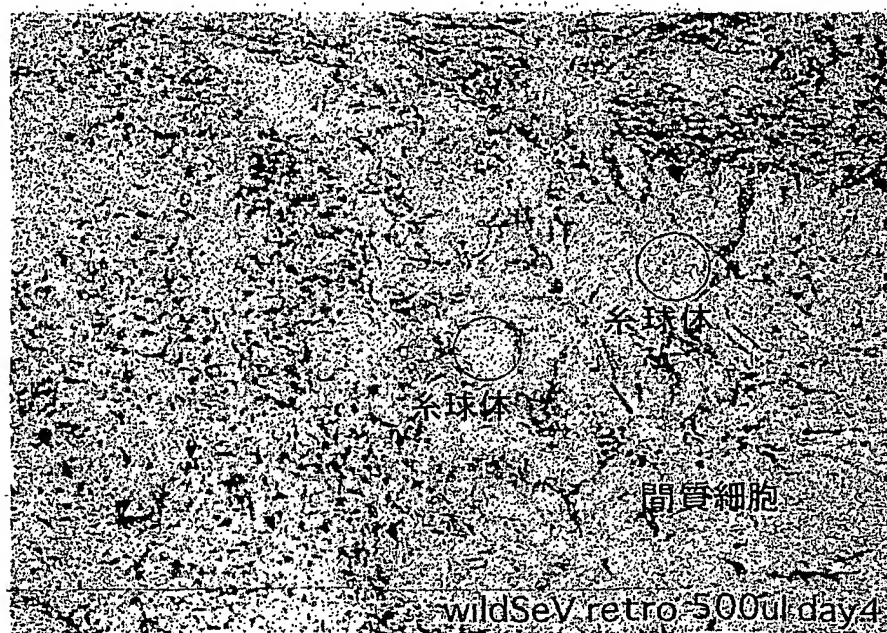
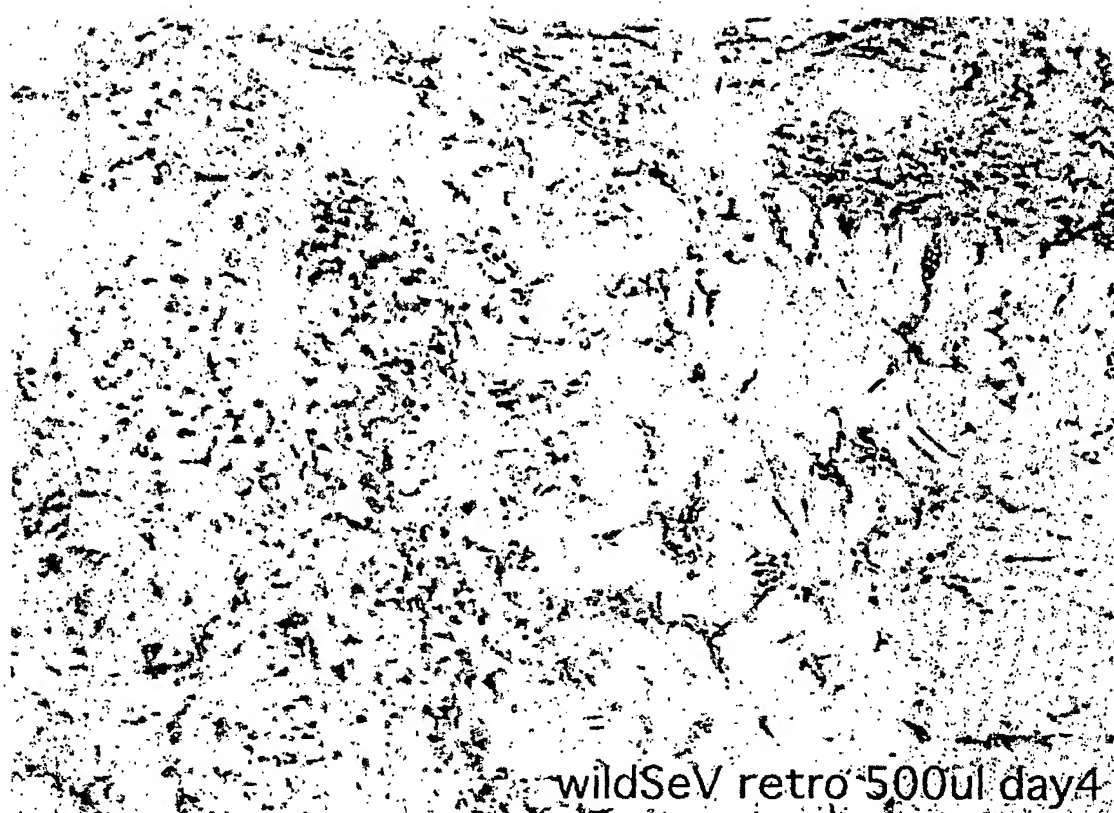


図 4





5 / 15

図 5

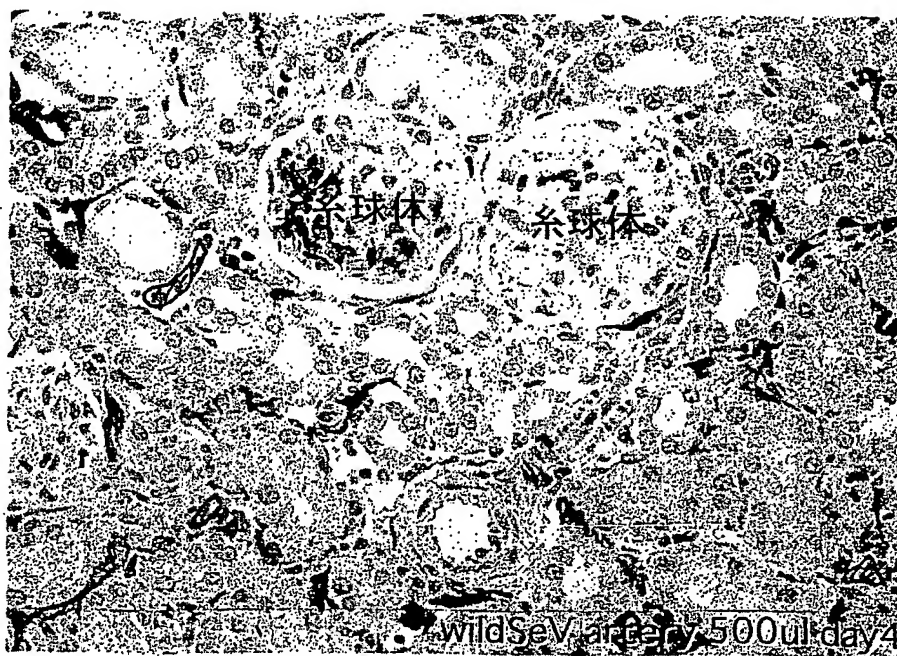
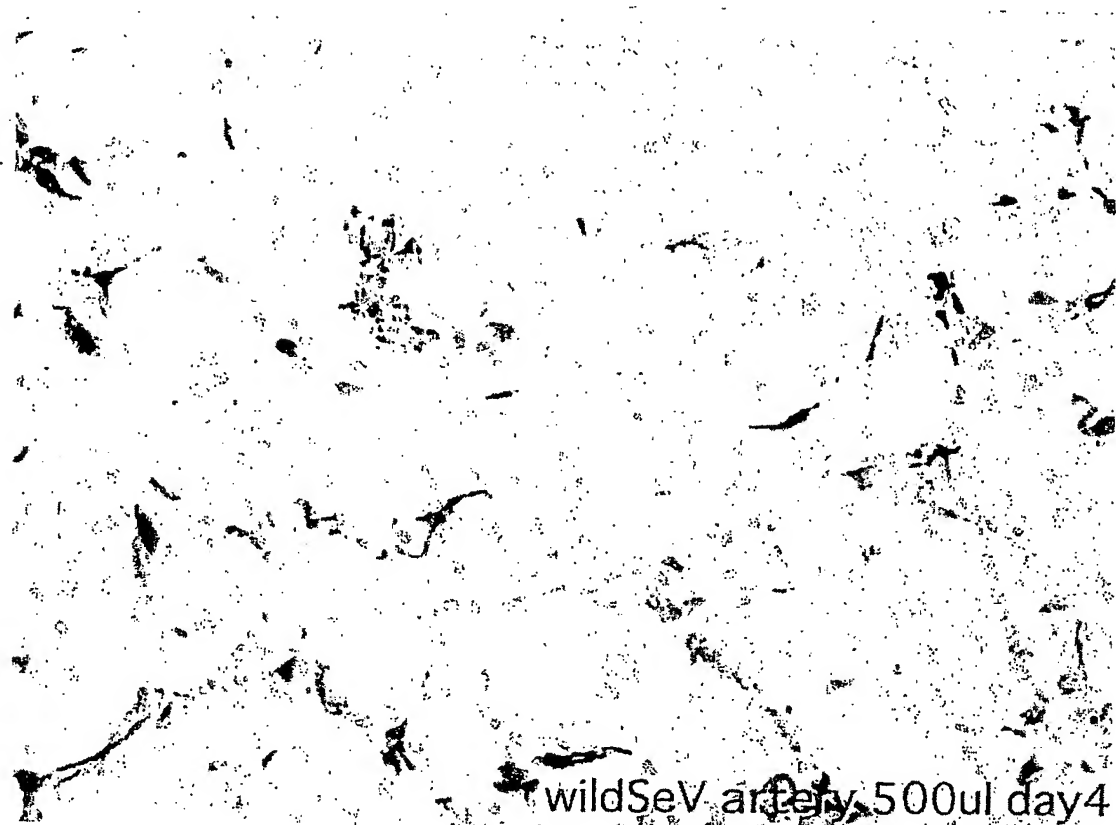
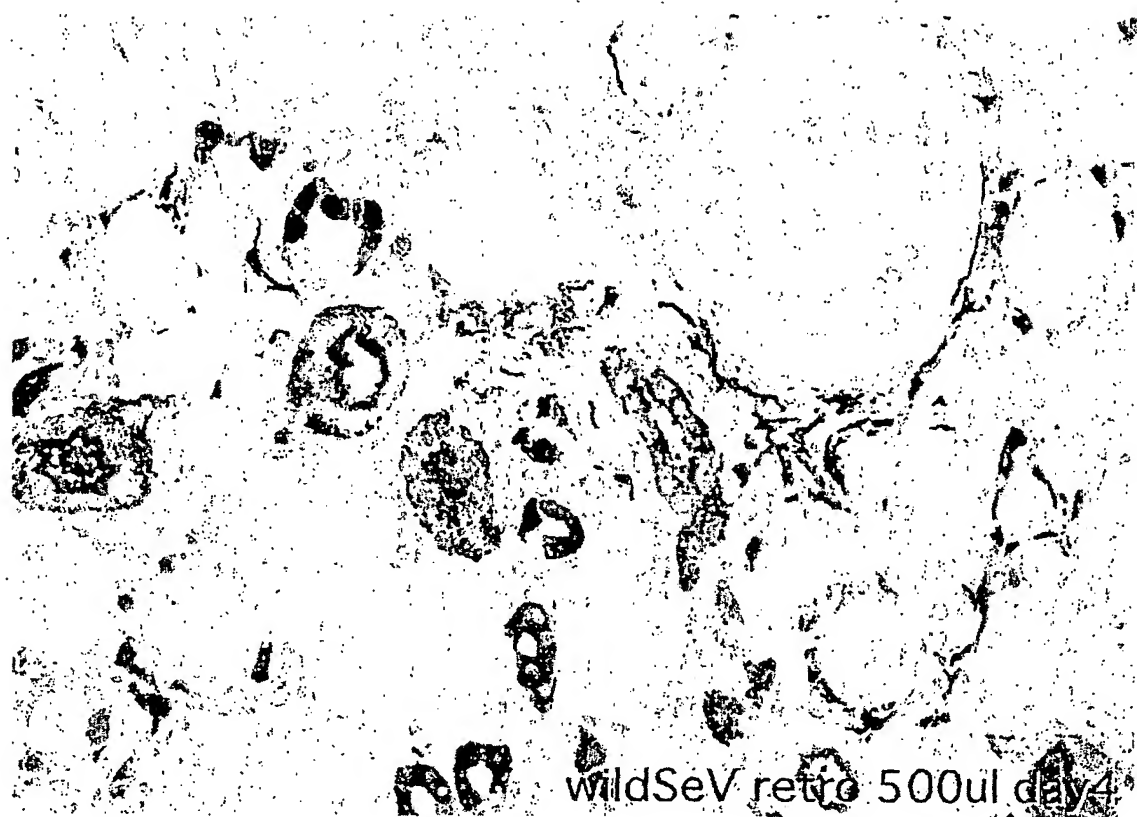


図 6



☒ 7

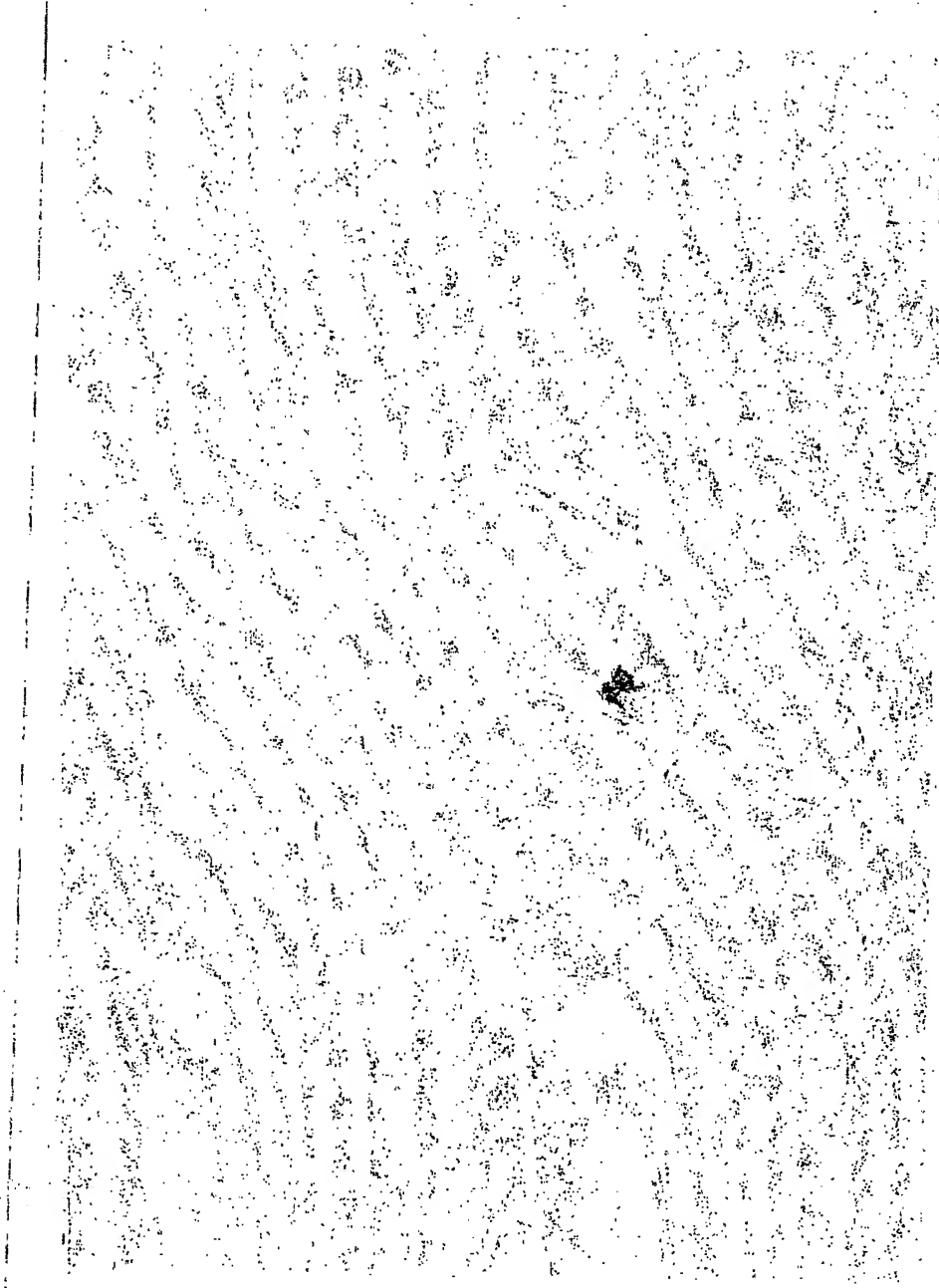
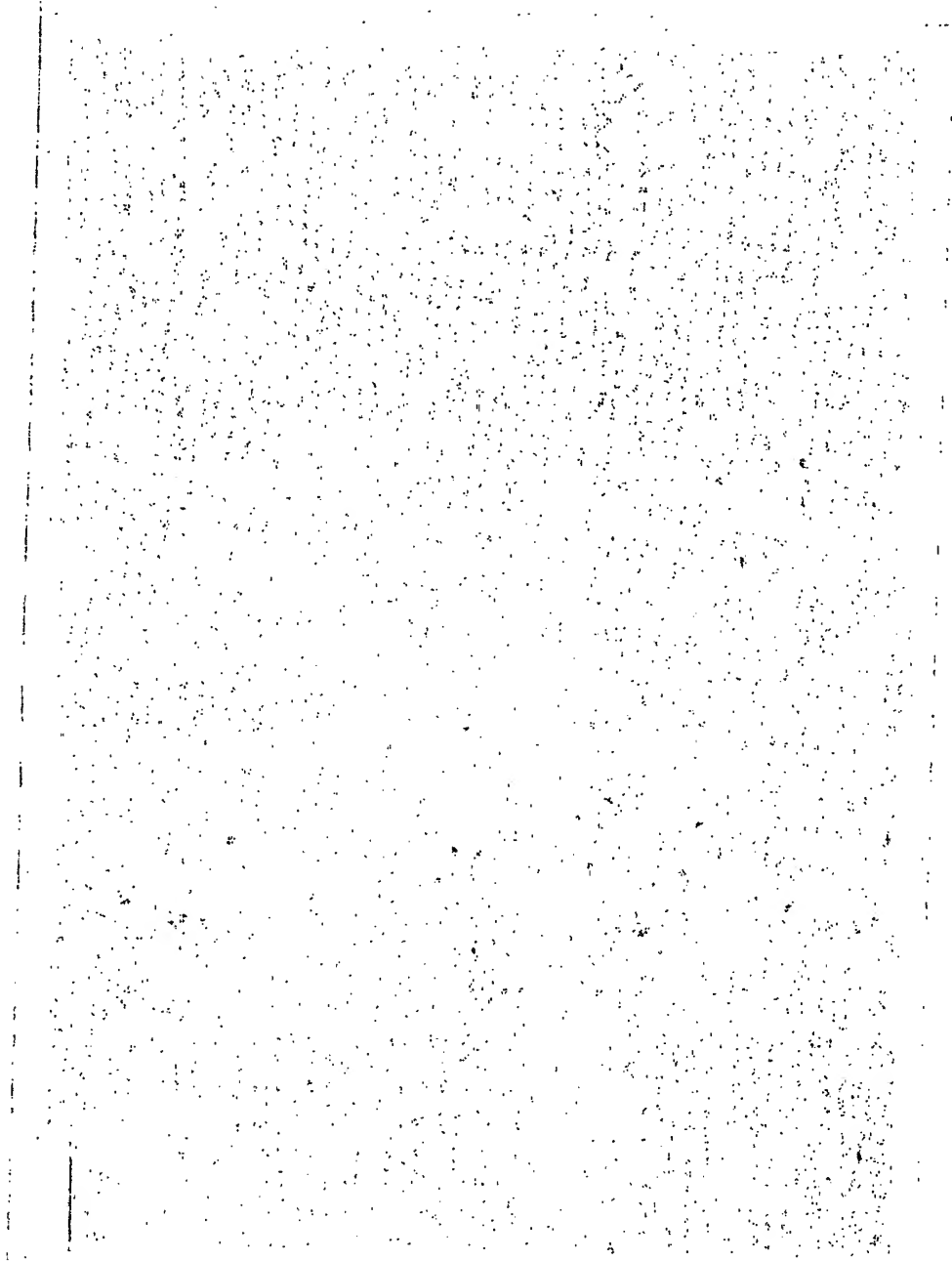


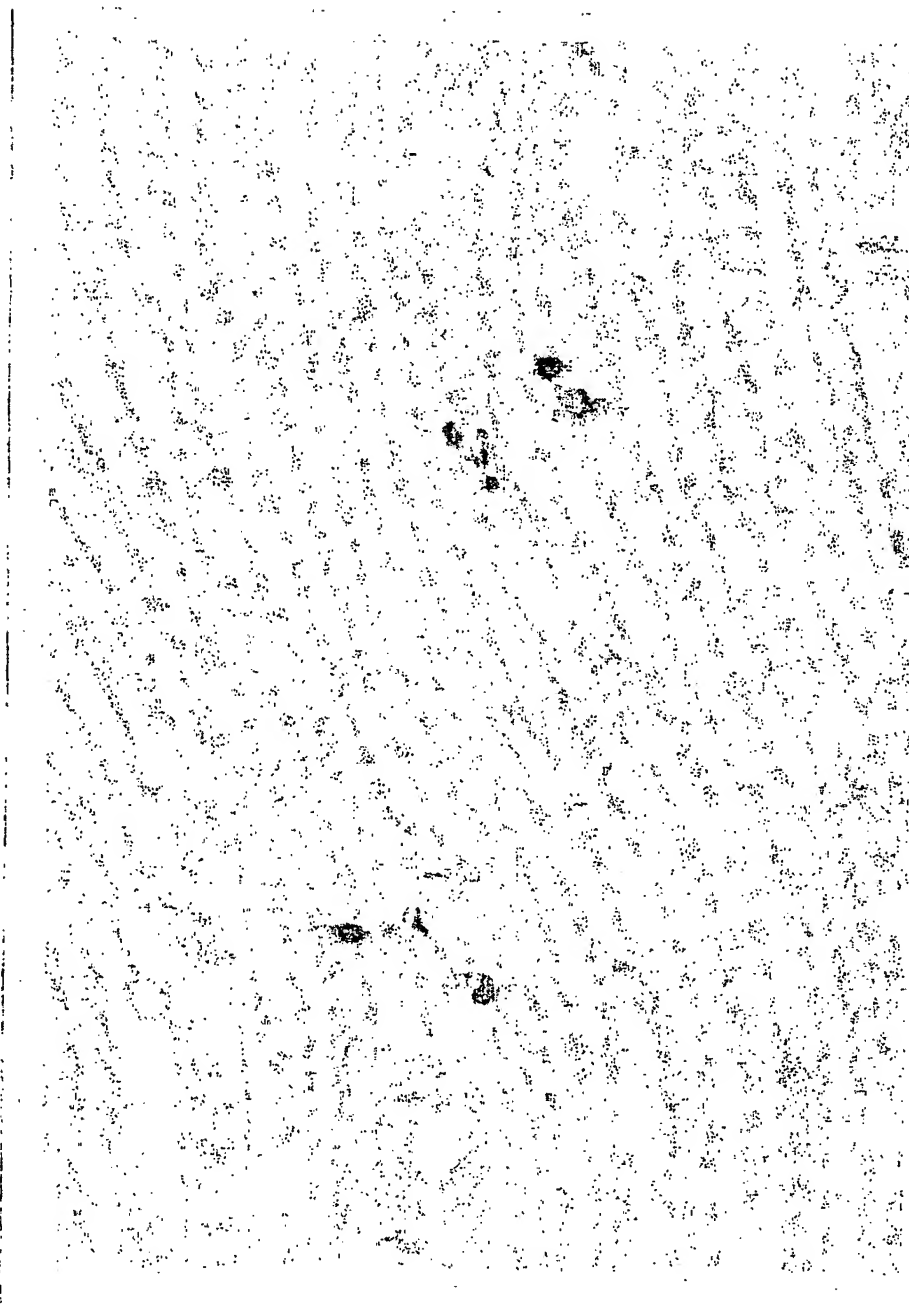
図 8

8 / 15



9/15

図 9

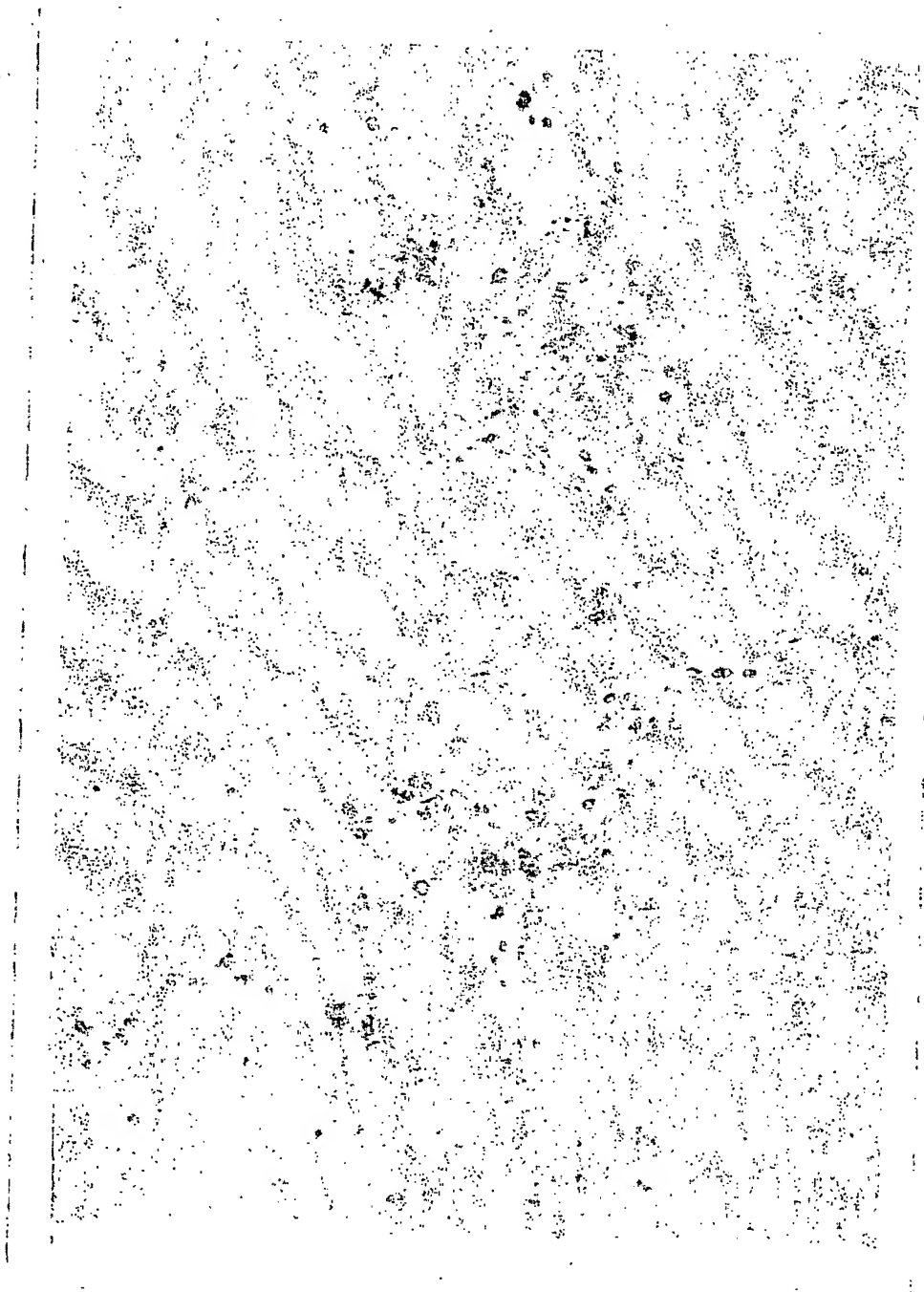


10/15

10

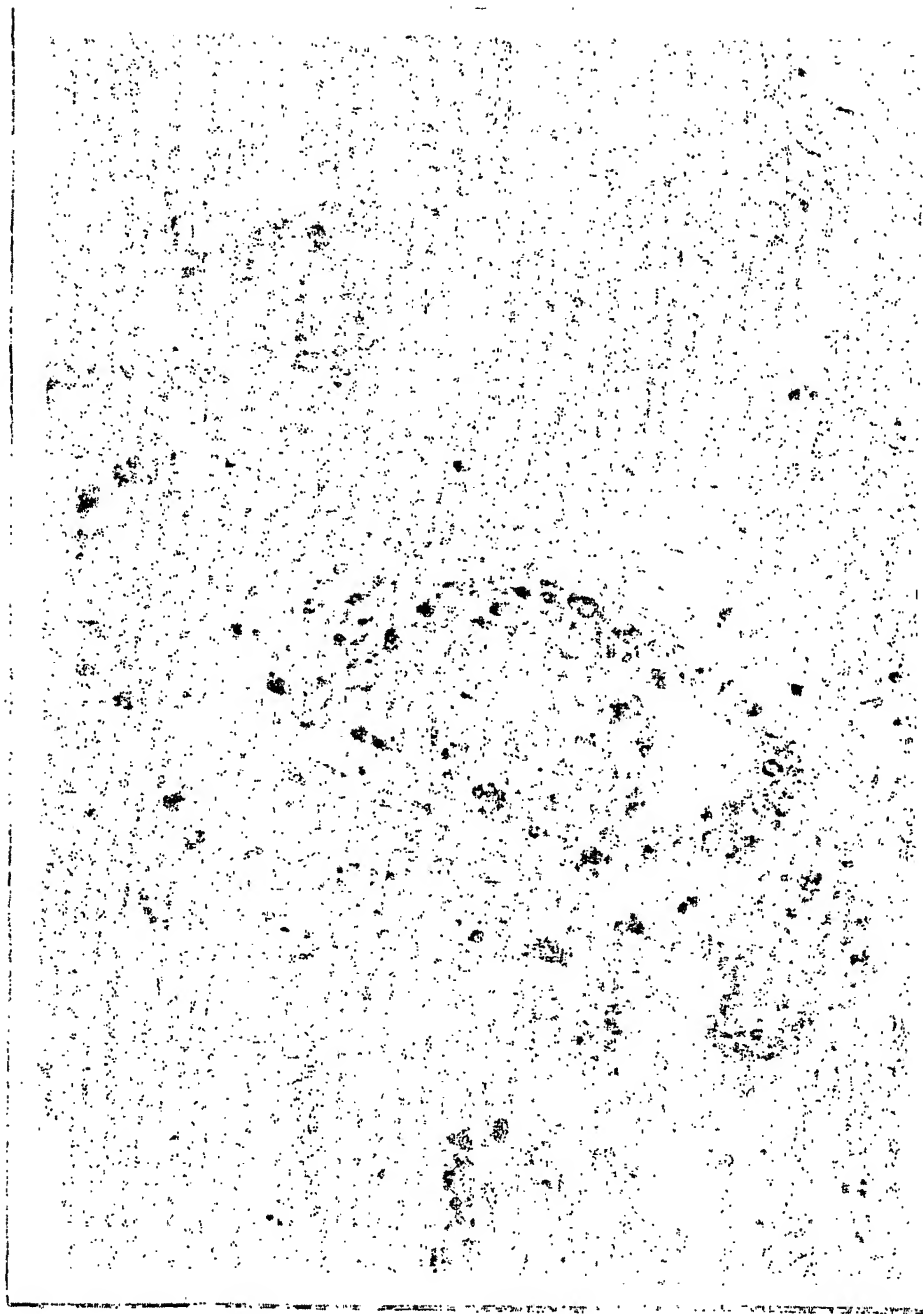
図 11

11/15



12/15

図 12





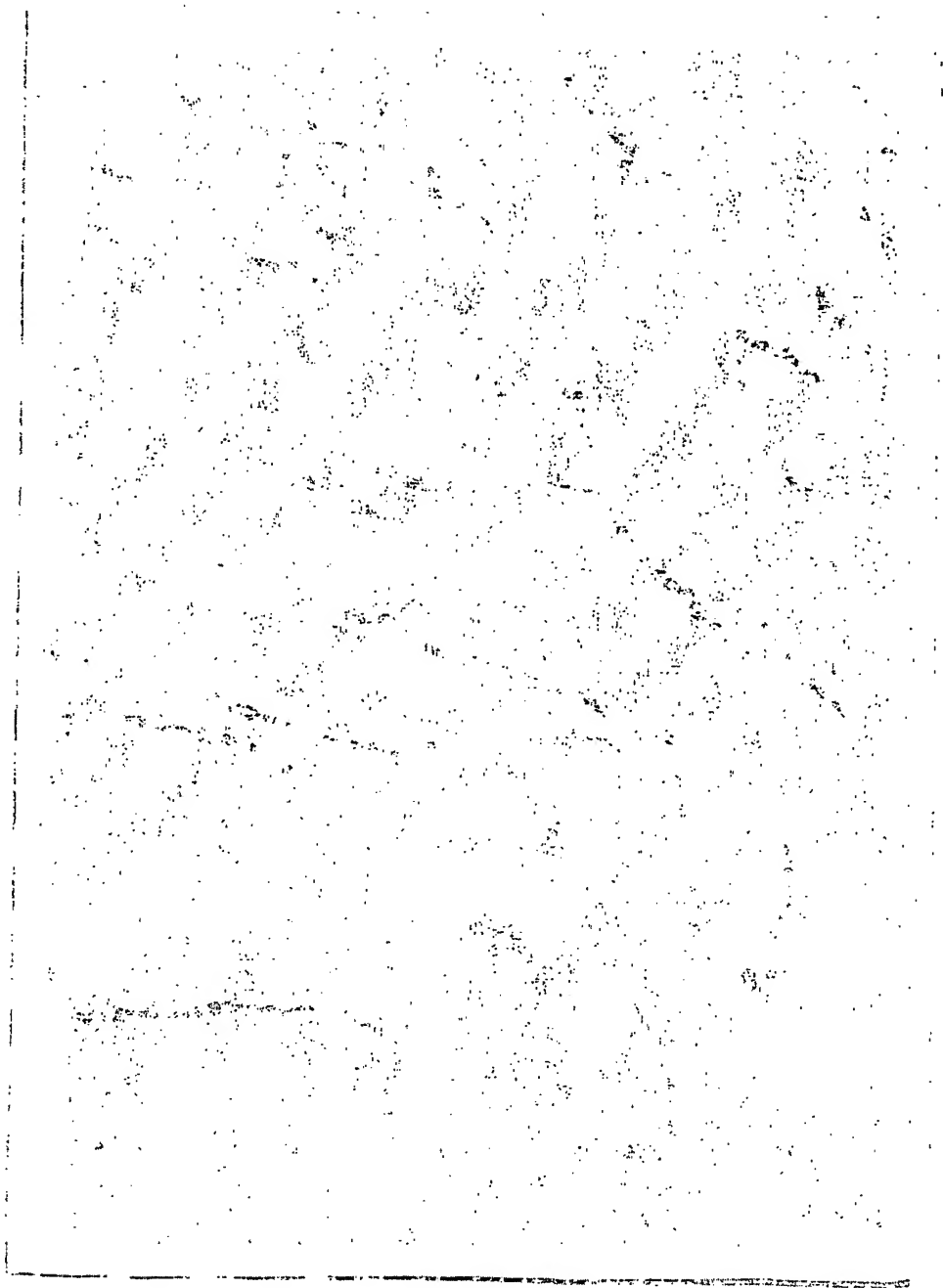
13 / 15

図 13



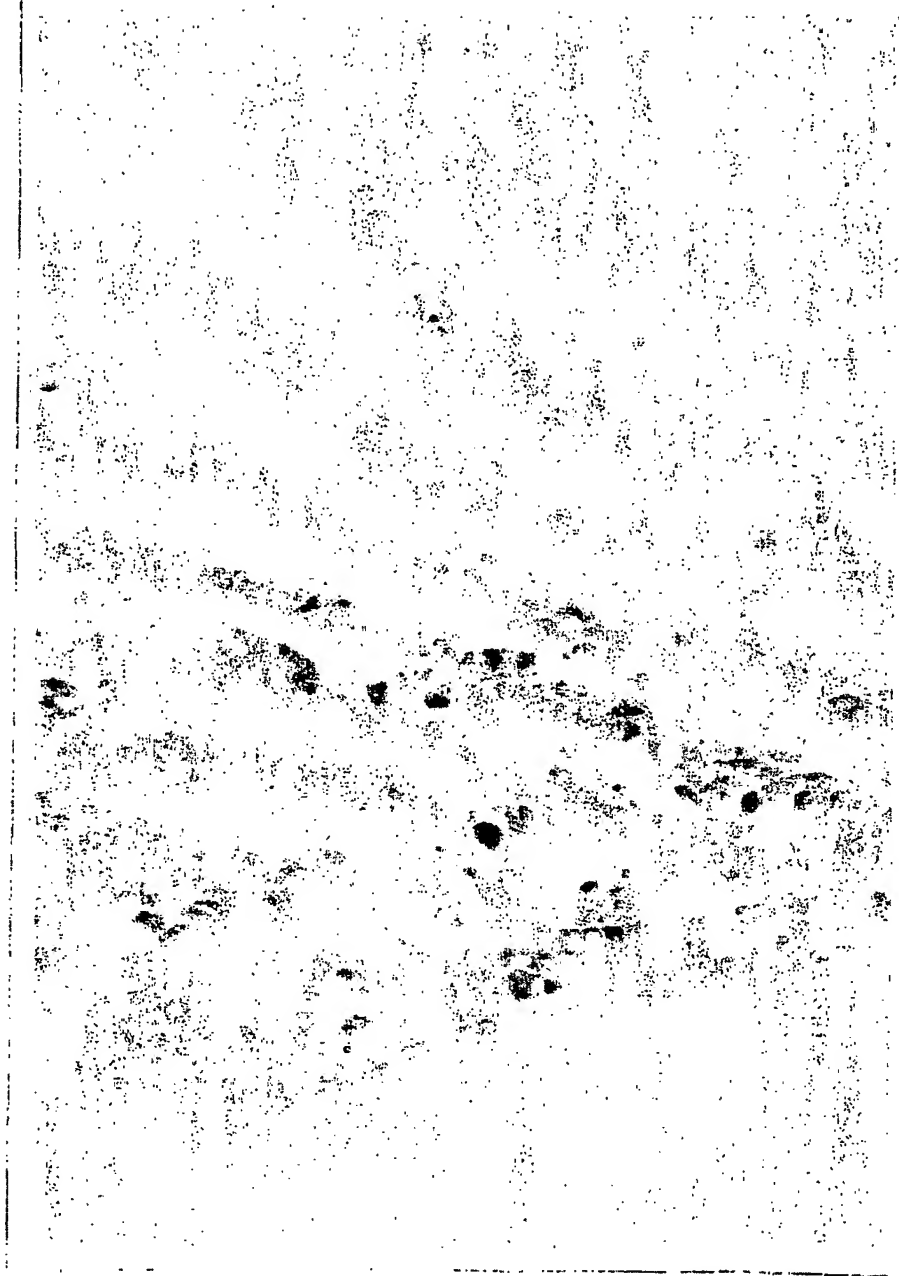
図 14

14/15



15 / 15

15



## SEQUENCE LISTING

<110> DNAVEC Research Inc.

<120> Virus vectors used for gene transfer into kidney cells

<130> D3-A0005P

<140>

<141>

<150> JP 2000-197870

<151> 2000-06-27

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Sequence

<400> 1

ctttcaccct

10

<210> 2

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Sequence

<400> 2

tttttcttac tacgg

15

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Sequence

<400> 3

cggccgcaga tcttcacg

18

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Sequence

<400> 4

atgcatgccg gcagatga

18

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 5

gttgagtact gcaagagc

18

<210> 6

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 6

tttgccggca tgcattttc ccaaggggag agttttgcaa cc

42

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 7

atgcatgccg gcagatga

18

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 8

tggtgaatg agagaatcag c

21

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 9

atgcatatgg tgatgcggtt ttggcagtac

30

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 10

tgccggctat tattacttgt acagctcgtc

30

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/05513

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A6148/00, 35/76, C12N15/86, C12N7/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A6148/00, 35/76, C12N15/86, C12N7/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN), JICST (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Masataka KITAMURA, "Shikyu-tai e no Idenshi Dounyu", Igaku no Ayumi, (1999), Vol.190, No.1, pages 111 to 115, especially, page 111, right column, line 10 to page 112, right column, line 2	7-13
X	MUNGER, Karen A. et al., "Transfection of rat kidney with human 15-lopoxxygenase suppresses inflammation and preserves function in experimental glomerulonephritis", PNAS, (1999), Vol. 96, No. 23, pages 13375 to 13380, especially, abstract; page 13376, left column, lines 9 to 25	7-13
X	TOMITA, Naruya et al., "Direct in Vivo Gene Introduction into Rat Kidney", Biochim. Biophys. Res. Commun., (1992), Vol. 186, No. 1, pages 129 to 134, especially, abstract	7-13
X	Naruya TOMITA et al., "HVJ-liposome-hou ni yoru Rat Jinshi Kyutai Saibou e no in vivo Idenshi Dounyuu-hou", Nippon Rinshou, (1992), Vol.50, pages 36(2847) to 40(2878), especially, Summary	7-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
25 September, 2001 (25.09.01)Date of mailing of the international search report  
09 October, 2001 (09.10.01)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/05513

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1-6  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  

Claims 1 to 6 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/05513

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ISAKU, Yoshitaka et al., "Application of gene therapy to kidney diseases", Clin. Exp. Nephrol., (1999), Vol.3, pages 147 to 153, especially, abstract	7-13
X	Yasufumi KANEDA, "Jin-koukashou no Byoutai Kaiseki to Idenshi Chiryou", Enshou, (1998), Vol.18, No.4, pages 265 to 269, especially, abstract	7-13
X	Yasufumi KANEDA, "Shuushoku Liposome ni yoru Idenshi Chiryou", Idenshi Igaiku, (1998), Vol.12, No.2, pages 16(196) to 17(197), especially, page 16	7-13
X	Naruya TOMITA, "Jikken-teki Jin-en ni okeru 2juu Kusari Oligonucleotide Dounyuu ni yoru Jinen no Chiryou-HVJ Liposonme-hou no Jin-en Chiryou e no Ouyou", Uehara Kinen Seimei Kagaku Zaidan Kenkyuu Houkoku-shuu, (1995), Vol.9, pages 317 to 319, especially, page 317, right column, lines 1 to 11	7-13
X	ARAI, Makoto et al., "In Vivo Transfection of Genes for Renin and Angiotensinogen into the Glomerular Cells Induced Phenotypic Change of the Mesangial Cells and Glomerular Sclerosis", Biochim. Biophys. Res. Commun., (1995), Vol. 206, No. 2, pages 525 to 532, especially, abstract	7-13
X	Database Medline on STN, US National Library of Medicine, (Bethesda, MD, U.S.A.), No.98222264, IMAI E. et al., "Gene transfer and kidney disease", Journal of Nephrology, (1998), Vol.11, No.1, pages 16-9	7-13
X	WO 00/01837 A1 (Dnavec Research Inc.), 13 January, 2000 (13.01.00), Claims & EP 1094115 A & AU 9943955 A	7 8-13
A	MOULLIER, Philippe et al., "Adenoviral-mediated gene transfer to renal tubular cells in vivo", Kidney Int., (1994), Vol.45, pages 1220 to 1225	7-13
PX	WO 01/57204 A1 (Yasufumi KANEDA), 09 August, 2001 (09.08.01), especially, abstract; Claims (Family: none)	7-13

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> A61K48/00, 35/76, C12N15/86, C12N7/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> A61K48/00, 35/76, C12N15/86, C12N7/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS(STN), MEDLINE(STN), EMBASE(STN), BIOSIS(STN), JICST(JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	北村 正敬、糸球体への遺伝子導入、医学のあゆみ、1999年、Vol. 190, No. 1, pp.111-115 <sup>ページ</sup> 、特に、第111 <sup>ページ</sup> 右欄第10行-第112 <sup>ページ</sup> 右欄第2行	7-13
X	MUNGER, Karen A. et al, Transfection of rat kidney with human 15-lipoxygenase suppresses inflammation and preserves function in experimental glomerulonephritis., PNAS, 1999, Vol.96, No.23, pp.13375-13380, 特に、Abstract, 第13376 <sup>ページ</sup> 左欄第9-25行	7-13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25.09.01

国際調査報告の発送日

09.10.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

滝下 浩一

4C

9284

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 1-6 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
請求の範囲1-6は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲                      は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲                      は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	TOMITA,Naruya et al, DIRECT IN VIVO GENE INTRODUCTION INTO RAT KIDNEY., Biochim. Biophys. Res. Commun., 1992, Vol.186, No.1, pp.129-134, 特に、Abstract	7-13
X	富田 奈留也 等、H V J-リボソーム方によるラット腎系球体細胞への <i>in vivo</i> 遺伝子導入法、日本臨牀、1992年、第50巻、第36(2847)-40(2878)ページ、特に、Summary	7-13
X	ISAKU,Yoshitaka et al, Application of gene therapy to kidney diseases., Clin. Exp. Nephrol., 1999, Vol.3, pp.147-153, 特に、Abstract	7-13
X	金田 安史、腎硬化症の病態解析と遺伝子治療、炎症、1998年、Vol. 18, No. 4, pp. 265-269, 特に、Abstract	7-13
X	金田 安史、修飾リボソームによる遺伝子治療、遺伝子医学、1998年、Vol. 12, No. 2, pp. 16(196)-pp. 17(197), 特に、p. 16	7-13
X	富田 奈留也、実験的腎炎における二重鎖オリゴヌクレオチド導入による腎炎の治療-H V Jリボソーム法の腎炎治療への応用-、上原記念生命科学財団研究報告集、1995年、第9巻、第317-319ページ、特に、第317ページ右欄第1-11行	7-13
X	ARAI,Makoto et al, IN VIVO TRANSFECTION OF GENES FOR RENIN AND ANGIOTENSINOGEN INTO THE GLOMERULAR CELLS INDUCED PHENOTYPIC CHANGE OF THE MESANGIAL CELLS AND GLOMERULAR SCLEROSIS., Biochim. Biophys. Res. Commun., 1995, Vol.206, No.2, pp.525-532, 特に、Abstract	7-13
X	Databasea Medline on STN, US National Library of Medicine, (Bethesda,MD,USA),No.98222264, IMAI E. et al, Gene transfer and kidney disease.JOURNAL OF NEPHROLOGY, 1998, Vol.11, No.1, pp.16-9	7-13
X	WO 00/01837 A1(株式会社 ディナベック研究所) 13. 1月. 2000(13.01.00)請求の範囲 & EP 1094115 A & AU 9943955 A	7 8-13
A	MOULLIER,Philippe et al, Adenoviral-mediated gene transfer to renal tubular cells in vivo., Kidney Int., 1994, Vol.45, pp.1220-1225	7-13
P X	WO 01/57204 A1(金田 安史) 9. 8月. 2001(09.08.01) 特に、Abstract, 請求の範囲, ファミリーなし	7-13

**DESCRIPTION****VIRUS VECTOR FOR INTRODUCING GENE INTO RENAL CELLS**5    Technical Field

The present invention relates to Paramyxovirus vectors to introduce genes into renal cells.

Background Art

10           In recent years, the technology of gene transfer into mammalian cells has been developed, and there has been a growing interest in treating various human diseases through gene therapy. Gene transfer into the living body is performed *in vivo* or *ex vivo*. The *in-vivo* gene transfer comprises administering a vector containing an insert  
15   such as a gene into the living body, while the *ex-vivo* transfer comprises introducing a gene into cells derived from a patient or other cells and then returning them in the body.

          Unlike gene transfer into cells such as cultured cells, in general, it is difficult to transfer genes into living organs. In  
20   particular, mammalian kidney comprises structurally complicated tissues with arteries, veins, renal tubules, glomeruli, and others, and its metabolic turnover is relatively lower. Thus, it has been difficult to transfer genes into this organ with sufficient efficiency. The structure of kidney is important for maintaining its  
25   normal function, and thus gene transfer should be performed without damaging the organ or tissues. For gene transfer into kidney cells, it should be noted that it is difficult to introduce genes with high efficiency into cells derived from a glomerulus, a renal tubule and an interstitium as targets.

30           Introduction of a gene into a kidney has been performed by, for example, a method using HVJ (hemagglutinating virus of Japan; Sendai virus) and liposome (Tomita, N. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 186: 129-134, 1992). Liposome comprising HMG-1 (high mobility group 1) protein and an expression plasmid vector for  
35   SV40 large T antigen gene was prepared, and then these were injected into rat kidney from the renal artery via a catheter to introduce



the gene into the kidney. The result showed that the expression of SV40 large T antigen was successfully detected in 15% of glomerular capillary vascular cells by the immunohistochemical method on the fourth day after gene transfer. However, the expression level  
5 reached a peak in several days after the introduction and then dropped, and only the glomerular cells expressed the gene. Similar experiments using HVJ-liposome have been conducted to introduce the human CD59 gene into dog kidney (Akami, T. et al., Transplantation Proceedings 26: 1315-1317, 1994). However, the expression of CD59  
10 gene in the glomerular cells was only transient and its level was not sufficiently high. For HVJ-liposome-based gene transfer, efforts have been made to improve the method of preparing liposome (Tsujie, M. et al., Kidney Int. 57: 1973-1980, 2000). However, the gene transfer efficiency is still unsatisfactory. In addition, the  
15 method of preparing HVJ-liposome is complicated, and prepared compositions have no sufficient stability.

Zhu et al. reported gene transfer into various tissues of adult mouse using a mixture of cationic liposome and plasmid DNA (Zhu, N. et al., Science 261(5118): 209-11, 1993). Transient expression was  
20 detected in cells derived from tissues such as lung, spleen, lymph nodes, bone marrow, and others after injection of the vector mixture into the blood vessels. Furthermore, genes were transferred into 25% to 50% of kidney endothelial cells. The report, however, mention neither possibility of gene transfer into glomerular cells, nor the  
25 duration of expression.

An adenoviral vector was reportedly used as a viral vector to achieve gene transfer into kidney (Moullier, P. et al., Kidney Int. 45(4): 1220-5, 1994). The  $\beta$ -galactosidase gene was introduced into adult rat kidney by perfusion from the renal artery, a  
30 replication-deficient adenovirus containing the  $\beta$ -galactosidase gene, or injection of the virus to renal pelvis via a catheter to cause backflow. In the case of the perfusion from the renal artery, low-level transient expression of  $\beta$ -galactosidase was observed. In contrast, in the case of the injection for backflow, the expression  
35 was observed in the renal papilla and medullary renal tubule, but not in kidney endothelial cells. In general, infection via

intravascular injection of adenoviral vectors does not ensure their sufficient infectivity to renal cells. Some modifications have been made to improve the methods of adenoviral gene transfer (U.S. patent No. 5,869,230). This patent describes that a kidney is cooled on ice or such to prevent ischemic injury during vector transfer; that oxygen shortage in cells is prevented by using an oxygen-supplying agent such as hemoglobin; that vector infection can be regulated by using a vasodilator such as dopamine; and that a vector can be introduced into 5% to 15% of kidney endothelial cells by this method.

However, adenoviral vectors have been reported to induce relatively high immune reactions. After initial non-specific inflammation reaction, the transfected cells were attacked through cytotoxic T lymphocyte-mediated specific immune reaction. Efforts have been made to develop adenoviral vectors with reduced immunogenicities through gene deletions and modifications, but are not still successful.

Viral vectors for gene therapy include retroviral vectors. Retroviral vectors have an advantage of ensuring long-term stable expression of a gene introduced by integrating the gene into host chromosome, but in general, their target is restricted to only certain cells and should be dividing cells. Since most of kidney cells are non-dividing cells that have been terminally differentiated, retroviral vector-mediated gene therapy is limited mainly in ex-vivo approaches. Pseudotyped vectors and lentivirus-based vectors have been developed, but such vectors have risks of activation of oncogenes and destruction of tumor suppression genes due to random chromosomal insertion. Other defects include difficulties of preparation of high titer viral vectors.

### Disclosure of the Invention

An objective of the present invention is to provide a viral vector that ensures high efficiency gene transfer into renal cells and the use thereof. More specifically, the present invention provides a Paramyxovirus vector for introducing genes into renal cells, a composition comprising the vector for gene transfer into renal cells, and a method of introducing genes into renal cells using

the vector.

In recent years, recombinant viral vectors for gene transfer based on Paramyxoviruses including Sendai virus have been developed by using technologies of reverse genetics for the viruses (Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996; Kato, A. et al., EMBO J. 16: 578-587, 1997; Yu, D. et al., Genes Cells 2: 457-466, 1997; Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997; Sakai, Y. et al., FEBS Lett. 456: 221-226, 1999). The present inventors performed gene transfer into a kidney using the recombinant Sendai virus vector to determine whether or not the use of the vector could overcome the problems of the previous gene transfer vectors. Specifically, the inventors studied *in-vivo* transfection activity of Sendai virus vector, including transfection efficiency, persistency and efficiency of gene expression, and effect of vector administration route, from the clinical standpoint.

As a result, a recombinant Sendai virus vector comprising exogenous genes was revealed to be able to transfer genes into renal cells with high efficiency *in vivo*. With either administration method of perfusion from the renal artery or of backflow from the urinary tract, the vector could transfer genes into renal cells diffusively over a wide area of kidney, and in particular, the administration from the renal artery resulted in high-level expression of GFP in cells such as interstitial cells and glomerulus cells. The persistent expression of the gene transferred via Sendai virus could be observed for at least about 1 month. In addition, in kidney tissues that were kept for a long period of time, the expression of the transgene was also detectable in renal tubular cells. On the other hand, in the administration to cause backflow from the urinary tract, the transgene was expressed mainly in renal tubular cells (distal and proximal renal tubules), and also expressed in interstitial cells.

Specifically, the present inventors have found: (1) that the recombinant Paramyxovirus vector can express a gene in renal cells with high efficiency; (2) that the vector allows to introduce a gene into different types of cells depending on the administration route and the administration from the renal artery results in no macrophage

infiltration to regions in proximity to interstitial cells and glomerular tissues; and (3) that the viral genome and the exogenous gene are expressed stably for long periods. These findings demonstrate that the Paramyxoviral vector is useful for gene transfer into kidney. The applicability of adenoviral vectors is currently tested in the field of gene transfer into kidney. For the purpose of gene transfer into kidney, the Paramyxoviral vector of the present invention can be a vector that has the compatibility equivalent to or higher than that of adenovirus. The recombinant Paramyxovirus vectors as well as adenoviral vectors have several important advantages such that both high level expression of transgenes and high gene transfer efficiency do not depend on the cell cycle.

A problem often associated with adenoviral vectors is that sufficient infectivity to target cells is not achieved by short time infection. This may be because long contact is required to achieve incorporation of vector particles into cells via Coxsackie-adenovirus receptor (CAR). In *in-vivo* administration to kidney, long-term blocking of bloodstream during administration results in tissue destruction due to ischemic injury. Thus, such long-term bloodstream blocking is unfavorable. In contrast, Paramyxovirus exhibits sufficiently high infectivity to cells with short-time exposure, and thus is highly advantageous in clinical gene transfer. Because of such benefits of Paramyxovirus vector, the Paramyxoviral vector of the present invention can be a very excellent vector for gene therapy in various clinical cases.

Specifically, the present invention relates to a Paramyxoviral vector for gene transfer to renal cells and a gene transfer method using the vector, and more specifically, to:

(1) a method of introducing a gene into a renal cell, wherein the method comprises contacting a Paramyxovirus vector with the renal cell;

(2) the method according to (1), wherein the method further comprises administering the Paramyxovirus vector into a blood vessel;

(3) the method according to (2), wherein the blood vessel is renal artery;

(4) the method according to (1), wherein the method further

comprises administering the Paramyxovirus vector into urinary tract;

(5) the method according to any one of (1) to (4), wherein the renal cell is selected from the group consisting of an interstitial cell, a glomerular cell and a renal tubular cell;

(6) the method according to any one of (1) to (5), wherein the Paramyxovirus is Sendai virus;

(7) a Paramyxovirus vector for gene transfer into a renal cell;

(8) a composition for gene transfer into a renal cell, wherein the composition comprises a Paramyxovirus vector or a cell comprising the vector;

(9) the composition according to (8), wherein the composition is administered into a blood vessel;

(10) the composition according to (9), wherein the blood vessel is renal artery;

(11) the composition according to (8), wherein the composition is administered into urinary tract;

(12) the composition according to any one of (8) to (11), wherein the renal cell is selected from the group consisting of an interstitial cell, a glomerular cell and a renal tubular cell; and

(13) the composition according to any one of (8) to (12), wherein the Paramyxovirus is Sendai virus.

Herein, a "Paramyxovirus vector" is defined as a vector (or carrier) that is derived from the Paramyxovirus and that is used for gene transfer to host cells. The Paramyxovirus vector of the present invention may be ribonucleoprotein (RNP) or a virus particle having infectivity. Here, "infectivity" is defined as the ability of the recombinant Paramyxovirus vector to transfer, through its cell adhesion and membrane fusion abilities, a gene contained in the vector to cells to which the vector is adhered. In a preferred embodiment, the Paramyxovirus vector of the present invention carries an exogenous gene in an expressible manner. The Paramyxovirus vector may have a replication ability, or may be a defective vector without the replication ability. Herein, "replication ability" is defined as the ability of virus vectors to replicate and produce infective virus particles in host cells infected with the virus vectors.

The term "recombinant" product refers to a compound or composition produced via a recombinant polynucleotide. The recombinant polynucleotide refers to a polynucleotide in which nucleic acids are not linked in a non-naturally occurring manner.

Herein, a "recombinant" Paramyxovirus vector is defined as a Paramyxovirus vector constructed by gene engineering or its amplified products. For instance, recombinant Paramyxovirus vectors can be generated by reconstitution of a recombinant Paramyxovirus cDNA.

Herein, a Paramyxovirus is defined as a virus of the *Paramyxoviridae* family or a derivative thereof. Paramyxoviruses used in the present invention include, for example, viruses belonging to the *Paramyxoviridae* such as Sendai virus, Newcastle disease virus, Mumps virus, Measles virus, Respiratory syncytial virus, rinderpest virus, distemper virus, simian parainfluenza virus (SV5), and type I, II, and III human parainfluenza virus. The virus of the present invention may be preferably a virus of the genus *Paramyxovirus* or a derivative thereof. Paramyxoviruses that can be used in the present invention includes, for example, type I human parainfluenza virus (HPIV-1), type III human parainfluenza virus (HPIV-3), type III bovine parainfluenza virus (BPIV-3), Sendai virus (also referred to as "type I mouse parainfluenza virus"), and type X simian parainfluenza virus (SPIV-10). Most preferably, the Paramyxovirus of the invention may be the Sendai virus. These viruses may be naturally-occurring, wild-type, mutant, laboratory-passaged strains, artificially constructed strains, etc. Incomplete viruses such as the DI particle (Willenbrink W. and Neubert W. J., J. Virol., 1994, 68, 8413-8417), synthesized oligonucleotides, and so on, may also be utilized as a material for generating the virus vector of the present invention.

Genes encoding proteins of a Paramyxovirus include NP, P, M, F, HN, and L genes. Here, the "NP, P, M, F, HN, and L genes" represent those encoding the nucleocapsid protein, phosphoprotein, matrix protein, fusion protein, hemagglutinin-neuraminidase, and large protein, respectively. Genes of each virus of the subfamily Paramyxovirus are described generally as follows. In general, NP gene may also be indicated as "N gene".

Paramyxovirus	NP	P/C/V	M	F	HN	-	L
---------------	----	-------	---	---	----	---	---

Rublavirus	NP	P/V	M	F	HN	(SH)	L
Morbillivirus	NP	P/C/V	M	F	H	-	L

For instance, the accession numbers of each gene of the Sendai virus classified as a Respirivirus of *Paramyxoviridae* in the nucleotide sequence database, are M29343, M30202, M30203, M30204, M51331, M55565, M69046, and X17218 for NP gene; M30202, M30203, M30204, M55565, M69046, X00583, X17007, and X17008 for P gene; D11446, K02742, M30202, M30203, M30204, M69046, U31956, X00584, X53056 for M gene; D00152, D11446, D17334, D17335, M30202, M30203, M30204, M69046, X00152, and X02131 for F gene; D26475, M12397, M30202, M30203, M30204, M69046, X00586, X02808, X56131 for HN gene; and D00053, M30202, M30203, M30204, M69040, X00587, and X58886 for L gene.

As used herein, the term "gene" refers to a genetic substance, including nucleic acids such as RNA and DNA. A gene may or may not encode a protein. For example, a gene may encode a functional RNA such as ribozyme or antisense RNA. A gene can be a naturally-occurring sequence or an artificially designed sequence. Furthermore, as used herein, the term "DNA" includes a single-stranded DNA and a double-stranded DNA.

The term "renal cell" refers to a cell in normal mammalian kidney and a cell infiltrating in diseased kidney. Such cells infiltrating into kidney include, for example, monocytes, macrophages and leukocytes.

Specifically, mammalian kidney comprises at least 15 types of cells, including the following:

- glomerular cell;
- mesangial cell;
- interstitial cell;
- renal tubular cell;
- podocyte; and
- endothelial cell.

The glomerular basement membrane (GBM) and epithelial cell are also included. In the present invention, these cells are included in the renal cells.

The renal artery refers to arteries inside and towards a kidney, including renal arteries branched from the abdominal aorta and the

downstream interlobular arteries, right renal arteries, and left renal arteries; arteries branching off near the hilum renalis; five segmental arteries and the downstream arcuate arteries. The renal vein refers to veins inside and towards a kidney, including right renal veins, left renal veins, interlobular veins, stellate veins, arcuate veins, and interlobar veins.

The present invention provides the use of Paramyxovirus vector for gene transfer into renal cells. The present inventors found that Paramyxovirus could allow introduction of genes into renal cells with high efficiency. The present inventors obtained the experimental results showing that the expression of transgenes was detected in a wide area in the kidney. In particular, when injected from the renal artery, the genes were confirmed to be transferred preferentially into interstitial cells and glomerular cells. These cells are important as target cells in renal diseases, and thus the vector of the present invention can be used suitably for gene therapy for renal diseases.

In addition, the present inventors revealed that the genes transferred into renal cells using a recombinant Paramyxovirus were persistently expressed at least over one month. This shows an advantage that continuous therapeutic effect can be obtained when gene therapies targeted at renal cells was performed using a recombinant Paramyxovirus vector.

Paramyxovirus vectors can be preferably utilized in clinical trials of human gene therapy in view of safety as well. First, it is a major obstacle in high efficient gene transfer that introduced DNA must be transported into the nucleus for the expression of an exogenous gene. In the case of Sendai virus and such, however, expression of an exogenous gene is driven by both cellular tubulin and its RNA polymerase (L protein) in the cytoplasm. This suggests that the Sendai virus does not interact with the genome of host cells, which avoids risks such as tumorigenesis. Second, the Sendai virus is known to be pathogenic in rodents causing pneumonia, but not in humans, which is supported by studies showing that the intranasal administration of the wild type Sendai virus does not do harm in nonhuman primates (Hurwitz J. L. et al., Vaccine, 1997, 15, 533-540).



These features suggest that Sendai virus vector can be utilized in human therapy, and further, support the notion that Sendai virus can be one of the promising alternatives in gene therapy to renal cells.

Thus, the finding obtained by the present invention that  
5 Paramyxovirus vector has various advantages in gene transfer into renal cells may bring great advance in gene therapy, especially those targeted at renal cells.

The recombinant Paramyxovirus vector of the present invention used for gene transfer into renal cells is not limited to any special  
10 kind. For instance, suitable Paramyxovirus vectors include vectors that are able to replicate and autonomously propagate. In general, the genome of the wild type Paramyxovirus contains a short 3' leader region followed by six genes encoding N (nucleocapsid), P (phospho), M (matrix), F (fusion), HN (hemagglutinin-neuraminidase), and L  
15 (large) proteins, and has a short 5' trailer region on the other terminus. The vector of the present invention that is able to replicate autonomously can be obtained by designing a genome having a similar structure to that described above. In addition, a vector for expressing an exogenous gene can be obtained by inserting the  
20 exogenous gene to the genome of the above vector. The Paramyxovirus vector of the invention may have an altered alignment of virus genes, compared with wild type virus.

The Paramyxovirus vector of the invention may have deletion(s) of some of the genes that are contained in the wild type virus. For  
25 instance, when the Sendai virus vector is reconstituted, proteins encoded by NP, P/C, and L genes are thought to be required in trans, but the genes may not be a component of the virus vector. In one embodiment, an expression vector carrying genes encoding the proteins may be co-transfected into host cells with another expression vector  
30 encoding the vector genome to reconstitute a virus vector. Alternatively, an expression vector encoding the virus genome is transfected into host cells carrying genes encoding the proteins, and thus a virus vector can be reconstituted by using the proteins provided by the host cell. The amino acid sequence of these proteins  
35 may not be identical to those derived from the original virus as long as it has an equivalent or higher activity in nucleic acid transfer,

and may be mutated or replaced with that of a homologous gene of another virus.

Proteins encoded by M, F, and HN genes are thought to be essential for cell-to-cell propagation of a Paramyxovirus vector. However, these proteins are not required when the vector is prepared as RNP. If genes M, F, and HN are components of the genome contained in RNP, products of these genes are produced when introduced into host cells, and virus particles having infectivity are generated. RNP vectors that produce an infective virus include a virus genomic RNA encoding N, P, M, F, HN, and L genes and RNP containing N, P, and L proteins. When such RNP is introduced into cells, virus genome is expressed and replicated through functions of the proteins, and thus infective virus vectors are amplified.

RNP can be introduced into cells as a complex with a transfection reagent such as lipofectamine and polycationic liposome. Specifically, a variety of transfection reagents can be used, for instance, DOTMA (Boehringer), Superfect (QIAGEN #301305), DOTAP, DOPE, DOSPER (Boehringer #1811169). Chloroquine may be added to prevent degradation in the endosome (Calos M. P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, 80, 3015). In the case of replicative viruses, the produced viruses can be amplified or passaged by re-infecting into cultured cells, chicken eggs, or animals (e.g. mammalian such as mice).

Vectors lacking the M, F, and/or HN genes are also used as the Paramyxovirus vector of the present invention. These vectors can be reconstituted by providing deleted gene products exogenously. Such vectors can still adhere to host cells and induce cell fusion like the wild type. However, daughter virus particles do not have the same infectivity as the original ones because the vector genome introduced into cells lacks one of the above genes. Therefore, these vectors can be useful as safe virus vectors that are capable of only a single gene transfer. For instance, genes deleted from the genome may be F and/or HN genes. Virus vectors can be reconstituted by co-transfection of an expression plasmid encoding the genome of a recombinant Paramyxovirus lacking the F gene, an expression vector for the F protein, and that for NP, P/C, and L proteins into host cells (International Publication numbers WO00/70055 and WO00/70070).

Alternatively, host cells in which the F gene is integrated into the chromosome may be used. The amino acid sequence of these proteins provided exogenously may not be identical to those of the wild type and may be mutated or replaced by a homologous protein of another virus as long as they provide equivalent or higher gene transfer activity.

The envelope protein of the Paramyxovirus vector of the invention may contain another protein than the envelope protein of the original vector genome. There is no limitation on such proteins. These include envelope proteins of other viruses such as the G protein of the vesicular stomatitis virus (VSV-G). Thus, the Paramyxovirus vector of the invention includes a pseudo type virus vector that has an envelope protein derived from a virus different from the original virus.

The Paramyxoviral vector of the present invention may also comprise, for example, on the viral envelop surface, proteins capable of adhering to particular cells, such as adhesion factors, ligands and receptors or chimeric proteins comprising a protein described above on the outer surface and viral envelop-derived polypeptides inside the virus. It enables the production of a vector targeting a particular tissue. These proteins may be encoded by the virus genome itself, or supplied at the time of virus reconstitution through expression of genes other than virus genome (for example, genes derived from another expression vector or host cell chromosome).

The virus genes contained in the vector of the present invention may be altered, for example, to reduce antigenicity or enhance RNA transcription efficiency or replication efficiency. Specifically, it is possible to alter at least one of the NP, P/C, and L genes, which are genes of replication factors, to enhance transcription or replication. It is also possible to alter the HN protein, a structural protein having hemagglutinin activity and neuraminidase activity, to enhance the virus stability in blood by weakening the former activity and to regulate infectivity by altering the latter activity. It is also possible to alter the F protein, which is implicated in membrane fusion, to regulate the fusion ability of membrane-fused liposomes. Furthermore, it is possible to analyze the antigen

presenting epitopes and such of possible antigenic molecules on the cell surface such as the F protein and HN protein and use them to generate a Paramyxovirus that is engineered to have weak antigen presenting ability.

5           When Sendai virus is used as a vaccine of the present invention, it may lack accessory genes. For example, the disruption of the V gene, one of the accessory genes of Sendai virus, results in reduction of pathogenicity of Sendai virus toward hosts such as mouse without affecting gene expression and replication in cultured cells (Kato,  
10   A. et al. 1997. J. Virol. 71:7266-7272; Kato, A. et al. 1997. EMBO J. 16:578-587; Curran, J. et al., WO 01/04272, EP 1067179). Such attenuated vectors are particularly suitable as vectors constituting vaccines of the present invention.

          A viral vector of the present invention can encode exogenous  
15   genes in its genomic RNA. A recombinant Paramyxovirus vector comprising exogenous genes can be prepared by inserting exogenous genes into the above-mentioned Paramyxovirus vector genome. The exogenous gene can be a desired gene to be expressed in target renal cells. The exogenous gene may encode a naturally occurring protein,  
20   or a modified protein prepared by modifying the original protein by deletion, substitution or insertion, as long as the modified protein is functionally equivalent to the naturally occurring protein. Such a gene may also encode a deletion protein derived from the naturally occurring protein, or an artificially designed protein. For  
25   instance, for the purpose of gene therapy and such, a gene used to treat a target disease may be inserted into the DNA encoding the genome of the virus vector. In the case of inserting an exogenous gene into Sendai virus vector DNA, a sequence comprising nucleotides of multiples of six is desirably inserted between the transcription end  
30   sequence (E) and the transcription start sequence (S) (Calain P. and Roux L., J. Virol., 1993, 67(8), 4822-4830). An exogenous gene can be inserted upstream and/or downstream of each of the virus genes (NP, P, M, F, HN, and L genes). In order not to interfere with the expression of upstream and downstream genes, an E-I-S sequence  
35   (transcription end sequence-intervening sequence-transcription start sequence) or a portion of it may be suitably placed upstream

or downstream of an exogenous gene so that E-I-S sequence is located between each gene. Alternatively, an exogenous gene can be inserted via IRES sequence.

Expression level of inserted exogenous genes can be regulated by the type of transcription start sequence that is attached to the upstream of the genes. It also can be regulated by the position of insertion and the sequence surrounding the gene. In the Sendai virus, for instance, the closer to the 3'-terminus of the negative strand RNA of the virus genome (the closer to NP gene in the gene arrangement on the wild type virus genome) the insertion position is, the higher the expression level of the inserted gene will be. To achieve a high expression of an exogenous gene, it is preferably inserted into the upstream region of the negative stranded genome such as the upstream of the NP gene (3' flanking sequence on the minus strand), or between NP and P genes. Conversely, the closer to the 5'-terminus of the negative strand RNA (the closer to L gene in the gene arrangement on the wild type virus genome) the insertion position is, the lower the expression level of the inserted gene will be. To reduce the expression of an exogenous gene, it may be inserted into the most 5' position on the negative strand, that is, downstream of the L gene in the wild type virus genome (5' flanking region of the L gene on the negative strand) or upstream of the L gene (3' flanking region of L gene on the negative strand). Thus, the insertion position of an exogenous gene can be properly adjusted so as to obtain a desired expression level of the gene or optimize the combination of the insert with the virus genes surrounding it. For instance, if the overexpression of a gene introduced by a high titer virus vector may cause toxicity, it is possible not only to control the virus titer, but also to reduce the expression level of individual Sendai virus vectors by designing the insertion position closer to the 5'-terminus of the negative strand, or replacing the transcription start sequence with one having lower efficiency so as to obtain an appropriate effect.

In general, high-level expression of an antigen protein is favorable for the immunity, as long as the protein exhibits no cytotoxicity. Therefore, it is preferable to connect the gene encoding an antigen protein to a transcription initiation sequence

of high transcription efficiency and insert it near the 3' end of the negative strand genome. Examples of suitable vectors are those in which an exogenous gene is placed downstream of all of the viral proteins of the Paramyxovirus in the negative strand genome of a Paramyxovirus vector. For example, a preferred vector has an exogenous gene upstream of the N gene (on the 3' side in the negative strand). Alternatively, an exogenous gene may be inserted immediately downstream of the N gene.

To help the easy insertion of an exogenous gene, a cloning site may be designed at the position of insertion. For example, the cloning site may be the recognition sequence of restriction enzymes. The restriction sites in the virus vector DNA can be used to insert an exogenous gene. The cloning site may be a multicloning site that contains recognition sequences for multiple restriction enzymes. The vector of the present invention may have other exogenous genes at positions other than that used for above insertion.

Construction of a recombinant Sendai virus vector having an exogenous gene can be performed as follows, for example, according to the method described in Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol., 1997, 78: 2813-2820, Kato A. et al., EMBO J., 1997, 16: 578-587, and Yu D. et al., Genes Cells, 1997, 2: 457-466.

First, a DNA sample containing a cDNA sequence encoding a desired exogenous gene is prepared. It is preferable that the concentration of the sample is 25 ng/ $\mu$ l or higher and that it can be detected as a single plasmid by electrophoresis. The following description is an example where an exogenous gene is inserted into the NotI site of virus genomic DNA. If the cDNA sequence contains a NotI site, the site is desirably removed in advance by altering the nucleotide sequence using the known method such as site-directed mutagenesis while maintaining the encoded amino acid sequence. A desired DNA fragment is amplified by PCR from the DNA sample. In order to obtain a fragment having NotI sites at both ends and to add a single copy of the transcription end sequence (E), intervening sequence (I), and transcription start sequence (S) of the Sendai virus (EIS sequence) to one end, synthesized DNA sequences (primer pair), namely, a pair of a forward primer (sense strand) comprising a part of the desired

gene, and a reverse primer (antisense) comprising a NotI recognition site, E, I, and S sequences, and part of the desired gene, is prepared.

For example, the forward synthetic DNA sequence contains two or more nucleotides at the 5'-terminus to ensure digestion with NotI (preferably 4 nucleotides not containing a sequence derived from the NotI recognition site, such as GCG and GCC; more preferably ACTT). To the 3'-terminus of the sequence, the NotI recognition sequence GCGGCCGC is added. Furthermore, to the 3'-terminus, as a spacer, any 9 nucleotides or those of 9 plus multiples of 6 are added. Furthermore, to the 3'-terminus, a sequence of approximately 25 nucleotides corresponding to the ORF of the desired cDNA starting from the initiation codon ATG is added. The 3'-terminus of the forward synthetic oligo DNA containing approximately 25 nucleotides of the desired cDNA is preferably selected so that the last nucleotide is G or C.

The reverse synthetic DNA sequence contains two or more nucleotides at the 5'-terminus (preferably 4 nucleotides not containing a sequence derived from the NotI recognition site, such as GCG and GCC; more preferably ACTT). To the 3'-terminus of the sequence, the NotI recognition sequence GCGGCCGC is added. Furthermore, to the 3'-terminus, a spacer oligo DNA is added to adjust the length of the primer. The length of the oligo DNA is designed so that it is a multiple of 6 nucleotides including the NotI recognition sequence GCGGCCGC, the sequence complementary to the cDNA, and the EIS sequence derived from the Sendai virus genome as described below (so-called "rule of six"; Kolakofski D. et al., J. Virol., 1998, 72, 891-899; Calain P. and Roux L., J. Virol., 1993, 67, 4822-4830). Furthermore, to the 3'-terminus of the added sequence, complementary sequences to the S sequence of the Sendai virus, preferably 5'-CTTTCACCCT-3' (SEQ ID NO: 1), to the I sequence, preferably 5'-AAG-3', and to the E sequence, preferably 5'-TTTTTCTTACTACGG-3' (SEQ ID NO: 2) are added. Finally, to the 3'-terminus, a sequence, which is selected so that the last nucleotide of the complementary sequence of the desired cDNA becomes G or C, is added, where the last nucleotide is approximately 25 nucleotides upstream from the termination codon. Thus, the 3'-terminus of the reverse synthetic

oligo DNA is prepared.

PCR can be performed by a common method using, for example, ExTaq polymerase (TaKaRa). Vent polymerase (NEB) may be used preferably, and the amplified fragment is digested with NotI, and inserted into the NotI site of the plasmid vector pBluescript. The nucleotide sequence of the obtained PCR product is checked with an automated DNA sequencer, and a plasmid having the correct sequence is selected. The insert is excised from the plasmid by NotI digestion, and subcloned into the NotI site of the plasmid comprising Paramyxovirus genomic cDNA. Alternatively, the PCR products may be directly cloned into the NotI site without using pBluescript vector to obtain recombinant Paramyxovirus virus cDNA.

For example, recombinant Sendai virus genomic cDNA can be constructed according to the methods described in Yu, D. et al., Genes Cells, 1997, 2, 457-466 or Hasan M. K. et al., J. Gen. Virol., 1997, 78, 2813-2820. For example, a spacer sequence of 18 bp containing the NotI site (5'-(G)-CGGCCGCAGATCTTCACG-3'; SEQ ID NO: 3) is inserted into an adjacent gene locus of a cloned Sendai virus genomic cDNA (pSeV(+)) between the leader sequence and the 5'-terminus of a sequence encoding the N protein, and the plasmid pSeV18<sup>b</sup>(+) containing a self-cleavable ribozyme site derived from the antigenomic strand of the hepatitis delta virus is obtained (Hasan M. K. et al., J. General Virol., 1997, 78, 2813-2820). An exogenous gene fragment is inserted into the NotI site of pSeV18<sup>b</sup>(+) to obtain a recombinant Sendai virus cDNA into which a desired exogenous gene has been inserted.

A viral genome-encoding DNA is ligated with an appropriate transcriptional promoter to construct a vector DNA. The resulting vector is transcribed *in vitro* or in cells, and RNP is reconstituted in the presence of Paramyxoviral L, P and NP proteins to produce a viral vector comprising the RNP. The present invention provides a method of producing a Paramyxovirus vector for introducing a gene into renal cells, or a method of producing a composition for gene transfer into renal cells comprising the vector, wherein the methods comprise transcribing the Paramyxovirus vector genomic DNA. The present invention also provides such viral-genome-encoding DNA for



producing a Paramyxovirus vector, wherein said DNA is used as a component of the Paramyxoviral vector of the present invention or a composition for gene transfer into renal cells comprising the vector. The present invention also relates to the use of DNA encoding the vector genome, for producing the Paramyxovirus vector of the present invention or the Paramyxovirus vector that is a component of the composition for gene transfer into renal cells comprising the vector. Reconstitution of a virus from virus vector DNA can be performed according to the known methods (WO97/16539; WO97/16538; Durbin A. P. et al., Virol., 1997, 235, 323-332; Whelan S. P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92, 8388-8392; Schnell M. J. et al., EMBO J., 1994, 13, 4195-4203; Radecke F. et al., EMBO J., 1995, 14, 5773-5784; Lawson N. D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92, 4477-4481; Garcin D. et al., EMBO J., 1995, 14, 6087-6094; Kato A. et al., Genes Cells, 1996, 1, 569-579; Baron M. D. and Barrett T., J. Virol., 1997, 71, 1265-1271; Bridgen A. and Elliott R. M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 15400-15404). These methods enable the reconstitution of Paramyxovirus vectors including the parainfluenza virus, vesicular stomatitis virus, rabies virus, measles virus, rinderpest virus, and Sendai virus vectors from DNA. If the F, HN, and/or M genes are deleted from the virus vector DNA, infective virus particles will not be formed. However, it is possible to generate infective virus particles by introducing these deleted genes and/or genes encoding an envelope protein from another virus into the host cells and expressing them.

Methods for introducing vector DNA into cells may include (1) forming DNA precipitates that can be incorporated into desired cells, (2) making a complex that comprises positively charged DNA, that is suitable for being incorporated into desired cells and that has low cytotoxicity, and (3) instantaneously opening a pore large enough for DNA to pass through in the desired plasma membrane using an electrical pulse.

A variety of transfection reagents can be used in (2), for instance, DOTMA (Boehringer), Superfect (QIAGEN #301305), DOTAP, DOPE, and DOSPER (Boehringer #1811169). For (1), transfection using calcium phosphate can be used. In this method, DNA incorporated by

cells is taken up into phagocytic vesicles, but it is known that a sufficient amount of DNA is also taken up into the nucleus (Graham F. L. and van Der Eb J., *Virology*, 1973, 52, 456; Wigler M. and Silverstein S., *Cell*, 1977, 11, 223). Chen and Okayama studied the optimization of the transfer technology and reported (1) that maximal efficiency is obtained when cells and precipitates are incubated under 2 to 4% CO<sub>2</sub> at 35°C for 15 to 24 hr, (2) that circular DNA has higher activity than linear DNA, and (3) that the optimal precipitates are formed when the DNA concentration in the mixed solution is 20 to 30 µg/ml (Chen C. and Okayama H., *Mol. Cell. Biol.*, 1987, 7, 2745). The method of (2) is suitable for transient transfection. More classically, a transfection method in which DEAE-dextran (Sigma #D-9885 M. W. 5 x 10<sup>5</sup>) is mixed with DNA at a desired concentration ratio is known. Because most complexes are degraded in the endosome, chloroquine may be added to enhance the transfection efficiency (Calos M. P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, 80, 3015). The method of (3), called electroporation, may be more broadly applied than the methods of (1) and (2) because it can be used for any kind of cells. The transfection efficiency can be maximized by optimizing the duration of pulse currents, the form of pulse, the strength of the electrical field (gap between electrodes, and voltage), conductivity of buffer, DNA concentration, and cell density.

Among the above three methods, the method of (2) is suitable for introducing DNA into cells to reconstitute the vector because it is easy to perform and enables the testing of a large number of samples using a large amount of cells. Preferable transfection reagents include, the Superfect Transfection Reagent (QIAGEN, #301305) and the DOSPER Liposomal Transfection Reagent (Boehringer Mannheim #1811169), but are not limited thereto.

Specifically, the reconstitution from cDNA are performed as follows.

LLC-MK2, a cell line derived from a monkey kidney, is cultured in a 24-well to 6-well plastic plate or in a 100-mm petri dish in minimum essential medium (MEM) containing 10% fetal calf serum (FCS) and an antibiotic (100 units/ml penicillin G and 100 µg/ml streptomycin) to be 70 to 80% confluent. Cells are then infected,

for instance, at 2 pfu/cell with recombinant vaccinia virus vTF7-3 that expresses T7 polymerase, which has been inactivated by a 20-minute UV exposure in the presence of 1 µg/ml psoralen (Fuerst T. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, 83, 8122-8126; and Kato. A. et al., Genes Cells, 1996, 1, 569-579). The amount of psoralen and the duration of UV exposure can be optimized. One hour after infection, cells are transfected by, for example, lipofection using Superfect (QIAGEN) with 2 to 60 µg of, or more preferably 3 to 5 µg of the above recombinant Sendai virus cDNA together with expression plasmids for virus proteins (24-0.5 µg pGEM-N, 12-0.25 µg pGEM-P, and 24-0.5 µg pGEM-L, or more preferably 1 µg pGEM-N, 0.5 µg pGEM-P, and 1 µg pGEM-L) (Kato. A. et al., Genes Cells, 1996, 1, 569-579) that function in trans and are required for producing a full length Sendai virus genome. The transfected cells are cultured in serum free MEM containing, if desired, 100 µg/ml rifampicin (Sigma) and cytosine arabinoside (AraC) (Sigma) whose concentration is more preferably 40 µg/ml, so that the drug concentration is adjusted to be optimal to minimize the cytotoxicity of the vaccinia virus and maximize the recovery of virus (Kato. A. et al., Genes Cells, 1996, 1, 569-579). Cells are cultured for 48 to 72 hr after transfection, then collected and lysed through three cycles of freeze-thawing. The cell lysates are transfected into LLC-MK2 cells, and after a 3- to 7-day culture, the culture medium is collected. To reconstitute a virus vector lacking a gene encoding an envelope protein that is incapable of replication, the vector may be transfected into LLC-MK2 cells expressing an envelope protein, or co-transfected with expression plasmid for the envelope protein. Alternatively, transfected cells can be overlaid and cultured on LLC-MK2 cells expressing envelope protein to propagate a deletion virus vector (International Publication Numbers WO0/70055 and WO0/70070). Alternatively, the above cell lysates prepared by freeze-thawing can be inoculated into the allantoic membrane of an embryonated chicken egg of ten days to collect the allantoic fluids after about three days. The virus titer of the culture medium or the allantoic fluids can be determined by measuring hemagglutinin activity (HA). The HA may be determined by "endo-point dilution" (Kato. A. et al., Genes Cells,

1996, 1, 569-579; Yonemitsu Y. and Kaneda Y., Hemagglutinating virus of Japan-liposome-mediated gene delivery to vascular cells., Molecular Biology of Vascular Diseases. Methods in Molecular Medicine, Ed. by Baker A. H., Humana Press, 1999, 295-306). To  
5 eliminate the possible contamination of vaccinia virus vTF7-3, the obtained allantoic fluid sample may be diluted appropriately ( $10^6$  times for instance) and re-amplified in chicken eggs. Re-amplification may be repeated, for example, three times or more. The obtained virus stock can be stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

10 The collected Paramyxovirus can be purified so as to be substantially pure. Purification can be carried out by a known purification/separation method such as filtration, centrifugation and column purification, or the combination thereof. The term  
15 "substantially pure" means that an isolated substance (compound, polypeptide, virus, etc.) comprises the major portion in a sample where it is present as a component. Typically, a substantially pure component in a sample comprises 50% or more, preferably 70% or more, more preferably 80% or more, yet more preferably 90% or more, of the total amount including the other components in the sample. Such a  
20 percentage can be estimated by a procedure known to those skilled in the art, for example, in weight ratio [w/w]. Those of solvent, salts, additive compounds and so on should be excluded to calculate the ratio. Exemplary purification methods specific for Paramyxovirus include methods using cellulose sulfuric ester or  
25 cross-linked polysaccharide sulfuric ester (Examined Published Japanese Patent Application No. (JP-B) Sho 62-30752; JP-B Sho 62-33879; JP-B Sho 62-30753), and methods which comprise allowing polysaccharide comprising fucose sulphuric acid and/or its degradation product to adsorb the virus (WO97/32010).

30 Host cells are not limited to any special types of cells as long as the virus vector can be reconstituted in the cells. Host cells may include LLC-MK2 cells, CV-1 cells derived from a monkey kidney, cultured cell lines such as BHK cells derived from a hamster kidney, and human-derived cells. Furthermore, to obtain a large quantity of  
35 the Sendai virus vector, embryonated chicken eggs may be infected

with virus vectors obtained from the above host cells and the vectors can be amplified. The method of producing virus vectors using chicken eggs has been established (Advanced protocols in neuroscience study III, Molecular physiology in neuroscience., Ed. by Nakanishi et al., Kouseisha, Osaka, 1993, 153-172). Specifically, for example, fertilized eggs are incubated for 9 to 12 days at 37 to 38°C in an incubator to grow the embryos. Virus vectors are inoculated into the allantoic cavity, and eggs are further incubated for several days to propagate the vectors. Conditions such as the duration of incubation may vary depending on the type of recombinant Sendai virus used. Then, the allantoic fluids containing viruses is recovered. Sendai virus vector is separated and purified from the allantoic fluid sample according to the standard method (Tashiro M., Protocols in virus experiments., Ed. by Nagai and Ishihama, MEDICAL VIEW, 1995, 68-73).

In preparing deletion virus vectors, two different virus vectors having deletion of a different envelope gene in the virus vector genome may be transfected into the same cell. In this case, each deleted envelope protein is supplied through expression from the other vector, and this mutual complementation permits the generation of infective virus particles, which can replicate and propagate. Thus, two or more of the virus vectors of the present invention may be simultaneously inoculated in a combination that complement each other, thereby producing a mixture of each envelope deletion virus vector at a low cost and in a large scale. Because these viruses lacking an envelope gene have a smaller genome, they can allow the insertion of a long exogenous gene. In addition, it is difficult for these viruses, which are intrinsically non-infective, to keep the status of co-infection after being diluted outside cells, and thus they are sterilized and less harmful to the environment.

Once a viral vector is prepared using, as the exogenous gene, a gene for the treatment of a disease, then the vector can be administered to perform gene therapy. When the viral vector of the present invention is used in gene therapy, an exogenous gene that ensures desired therapeutic effects or an endogenous gene whose expression is impaired in the body of a patient can be expressed either

by a method of direct administration or by a method of indirect (ex vivo) administration for gene expression. There is no limitation on the type of exogenous gene, including not only a nucleic acid encoding a protein but also a nucleic acid encoding no protein, for example, antisense or ribozyme.

The Paramyxovirus vector of the present invention can be made as a composition for gene transfer into renal cells together with a desired, pharmaceutically acceptable carrier. Herein, a "pharmaceutically acceptable carrier" is defined as those materials that can be administered with a vector and does not significantly inhibit gene transfer achieved by the vector. For instance, the Paramyxovirus vector of the invention may be appropriately diluted with saline, phosphate buffered saline (PBS), and so on, to make a composition. If the Paramyxovirus vector of the invention is propagated in chicken eggs, the composition may contain allantoic fluids. Also, the composition may contain carriers or media such as deionized water or a 5% dextrose aqueous solution. It may further contain plant oils, suspensions, detergents, stabilizers, antibiotics, etc. Furthermore, preservatives and other additives can also be added in the composition.

An exogenous gene which is carried by the Paramyxovirus vector can be transferred into renal cells, by contacting renal cells with the Paramyxovirus vector obtained as described above or a composition comprising the vector. The present invention provides the use of the Paramyxovirus vector to introduce a gene into renal cells. The type of infection route is not limited and include, for example, systemic administration by intravenous injection or such and topical administration to restrict the area where the vector is introduced. The topical administration to kidney can be achieved by administration into kidney blood vessels, urinary tract, renal pelvis, parenchyma of kidney, etc. Specifically, preferred route of the administration include injection from the renal artery or vein and injection from the urinary tract or renal pelvis to cause backflow (Tomita, N. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 186: 129-134, 1992; Isaka, Y. et al., J. Clin. Invest. 92: 2597-2601; Arai, M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 206: 525-532, 1995; Heikkila, P. et al., Gene

Ther. 3: 21-27, 1996; Rappaport, J. et al., Kidney Int. 47: 1462-1469, 1995; Oberbauer, R. et al., Kidney Int. 48: 1226-1232, 1995; Haller, H. et al., Kidney Int. 50: 473-480, 1996; Lien, Y. et al., Exp. Nephrol. 5: 132-136; Moullier, P. et al., Kidney Int. 45: 1220-1225, 1994; Bosch, R. et al., Exp. Nephrol. 1: 49-54, 1993; Zhu, G. et al., Gene Ther. 3: 298-304). In particular, injection of the vector via blood vessels is preferred because such injection may result in gene transfer into interstitial cells and glomerulus with high efficiency and induce no infiltration of macrophages near these cells.

10 In injection via a blood vessel, for example, a vector comprising a gene of interest may be injected into an artery via a catheter (see, U.S. patent No. 5,328,470) or a winged infusion set (Terumo Medical Corporation). It is preferable to block the blood stream with a clamp or such during injection. For example, a catheter  
15 is inserted into the left renal artery, the artery is clamped near the abdominal aorta to block the blood stream, and after perfusion with saline, a vector solution is injected to introduce a gene. This results in gene transfer into cells in the left kidney.

Such a method comprises steps of: (a) blocking the blood stream  
20 in a renal blood vessel; (b) injecting the Paramyxoviral vector of the present invention into the renal blood vessel; and (c) incubating for infection of the vector. The blood stream to be blocked is, for example, the blood stream in the renal artery. It is preferable to inject the vector while the artery is blocked, block the vein, then  
25 carry out incubation.

Specifically, for example, the blood stream to the kidney can be blocked by clamping the aorta immediately below the superior mesenteric artery and above the inferior mesenteric artery. As described above, only the blood stream to either right or left kidney  
30 can be blocked. After perfusion with saline, the vector of the present invention can be injected directly from the renal artery using a needle of appropriate gauge. After infection of the vector by incubation for a short time, the clamp is removed to resume the blood stream.

The vector can be injected by inserting a catheter from the  
35 common carotid artery and thoracic aorta toward a proximal portion of the renal artery (Tomita, N. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun.

186: 129-134, 1992). In this case, for example, the blood stream is blocked at a distal portion of the renal artery by clamping the abdominal aorta. After perfusion with saline, a vector solution is injected via the catheter. The vector may be injected via the blood vessel by any other known method.

When introducing the vector from the urinary tract to cause backflow towards a kidney, a syringe or catheter is inserted into the urinary tract to inject a vector solution therefrom. Blood vessels can be blocked with clamps or such during injection. This method comprises steps of: (a) blocking the blood stream of a renal blood vessel; (b) introducing the Paramyxoviral vector of the present invention into the urinary tract; and (c) incubating for infection of the vector. For example, the vector can be injected after the left renal vein is blocked by clamping. Once a catheter is inserted into the urinary tract, a vector solution can be injected near or into the renal pelvis or other region.

Incubation may be carried out, for example, for several minutes (about 1 minute to about 10 minutes), to achieve vector infection. If the blood stream is blocked, it is preferable to resume it in short time that ensures sufficient infectivity. Because such blocking for longer than 10 minutes may produces ischemic injury of tissues. When the blood stream blocking is prolonged, it is preferable to cool the tissues with ice or such to reduce the risk of tissue damages.

Further, the combination of the viral vector with a biocompatible polyol (for example, poloxamer 407 or such) allows to increase the transfer efficiency of the viral vector at 10 to 100 times (March et al., Human Gene Therapy 6: 41-53, 1995). This allows to reduce the dose of the viral vector and the time for infection. In the present invention, the Paramyxoviral vector of the present invention can be provided as a composition by combining with a biocompatible polyol. Another biocompatible polyol can be used in combination. Further, various drugs increasing or decreasing the blood pressure can be administered in combination with the vector. These drugs can be administered together with the vector at the same time, or separately.

Furthermore, the ex-vivo gene transfer into renal cells can



be achieved according to the method of the present invention (Kitamura, M. et al., J. Clin. Invest. 94: 497-505; Kitamura, M. et al., Kidney Int. 51: 1274-1279, 1997; Naito, T. et al., Mol. Med. 2: 297-312, 1996; Koseki, C. et al., Am. J. Physiol. 261: C550-C554, 1994; Heikkila, P. et al., Gene Ther. 3: 21-27, 1996; Zeigler, S. et al., Transplantation 61: 812-817, 1996). For example, for transplantation, a kidney is surgically removed from a donor, and the vector of the present invention is introduced into this kidney. Alternatively, renal cells are collected from the kidney and the gene is introduced into the cells, followed by injection of the cells into patient's body. Such cells include, for example, mesangial cells, macrophages, and renal tubular epithelial cells. Specifically, for example, mesangial cells may be collected from a kidney of a patient by biopsy, and returned to the patient's kidney after gene transfer. The vector of the present invention can be used to achieve gene transfer into such mesangial cells. Alternatively, ex-vivo transfection to the interstitium can be achieved by introducing a gene into renal tubular epithelial cells and carrying out intracapsular transplantation of the cells.

There is no limitation on the type of renal cell that is a target in gene transfer using the Paramyxoviral vector of the present invention. Such renal cells include, for example, cells of the interstitium, glomerulus, blood vessel (including artery, vein and capillary vessel) and renal tubule (including distal renal tubule and proximal renal tubule). Specifically, preferred target cells are interstitial fibroblast cells, mesangial cells, vascular endothelial cells, renal tubular epithelial cells (TEC), macrophages, etc. Such target cells also include adult and fetal renal cells (including cells of metanephros, mesonephros and pronephros). It is also possible to introduce a gene into renal primordial cells such as mesenchymal cells.

There is no limitation on the type of gene that is to be transferred using the Paramyxovirus of the present invention. Such genes may encode naturally occurring proteins or artificial proteins. Naturally occurring proteins include, for example, hormones, cytokines, growth factors, receptors, enzymes, and peptides. Such

a protein can be a secretory protein, a transmembrane protein, a cytoplasmic protein, a nuclear protein, etc. Artificial proteins include, for example, fusion proteins such as chimeric toxin, dominant negative proteins (including soluble molecules of receptors and membrane-bound dominant negative receptors), deficient-type cell-adhesion molecules, and cell-surface molecules. Such a protein can comprise an addition of a secretory signal, a membrane localization signal, or a nuclear translocation signal. A gene to be introduced may be a gene which is not originally expressed in renal cells. Alternatively, a gene which is normally expressed in renal cells can be introduced to be overexpressed. It is also possible to suppress the functions of an undesirable gene expressed in renal cells by introducing an antisense RNA molecule or ribozyme that cleaves RNA.

The vector of the present invention can be applied to gene therapy for various renal diseases. Such gene therapy can be carried out, for example, to compensate for the expression defects in cells caused by gene deficiency, to confer a new function by introducing an exogenous gene into cells, or to suppress an undesirable activity in cells by introducing a gene that suppresses the activity of a certain gene. The vector of the present invention is also useful to transfer a gene into nonhuman mammalian renal cells. For example, the vector is useful to establish various disease models and to develop or evaluate therapeutic methods in disease model, in renal transplantation, etc.

The present invention is applicable, for example, to renal transplantation. An exogenous gene can be introduced into a transplant using the vector of the present invention in allotransplantation or xenotransplantation of kidney. For example, it is possible to suppress post-transplantation acute rejection by expressing a gene capable of suppressing the rejection (see, for example, Zeigler, S. et al., Transplantation 61: 812-817, 1996). Alternatively, renal cells such as macrophages, mesangial cells or endothelial cells are isolated as describe above and an exogenous gene is introduced into the cells, which can be transferred into a kidney. The administration of mesangial cells by transplantation can

be carried out, for example, by the known mesangial cell-vector system (Kitamura, M. et al., J. Clin. Invest. 94: 497-505, 1994; Kitamura, M. Exp. Nephrol. 5: 118-125, 1997). With this method, the mesangial cells will be trapped in glomerular capillaries and express the  
5 exogenous gene. Alternatively, it is possible to use macrophage vectors or such (Kitamura, M. et al., Kidney Int. 51: 1274-1279). For example, genes encoding various cytokines, immunosuppressor proteins or antifibrinolytic proteins may be introduced into inflamed glomerulus.

10 The present invention can be used to treat kidney cancers. A gene for treating cancers can be introduced into cancerous lesions via an arterial catheter or such. Genes to be used for this purpose include those encoding cytokines and those encoding proteins inhibiting angiogenesis such as soluble vascular endothelial growth  
15 factor (VEGF) receptor.

The vector of the present invention can also be used to introduce the gene encoding nitric oxide synthase (NOS) or a gene inhibiting the function of intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), for treating acute tubular necrosis. It is also possible to use the vector  
20 of the present invention for other purposes such as prevention of renal arterial stenosis after angioplasty or treatment of polycystic kidney disease.

Other diseases to which the present invention is applicable include acute glomerulonephritis (AGN) caused by bacterial infection  
25 in the upper respiratory tract or such, rapidly progressive glomerulonephritis (RPGN), chronic glomerulonephritis (CGN) (including minimal change, focal glomerular sclerosis, membranous nephropathy, mesangial proliferative glomerulonephritis, membranoproliferative glomerulonephritis and sclerosing  
30 glomerulonephritis), secondary glomerular diseases in which the glomerulus is affected secondarily following diabetes, hepatitis, and others, and nephrotic syndrome. The present invention can also be used to treat endocapillary proliferative nephropathy, crescentic nephropathy, and others. It will be also possible to use the present  
35 invention to prevent and treat renal disorders caused by infection by human immunodeficiency virus (HIV) or such.

Further, specific examples of diseases or disorders which can be treated by the vector of the present invention targeting renal cells, and candidate genes for the treatment are as follows:

1. chronic glomerulonephritis	hepatocyte growth factor (HGF), Smad 6/7, dominant negative TGF- $\beta$ receptor
2. diabetic nephropathy	hepatocyte growth factor (HGF), Smad 6/7, dominant negative TGF- $\beta$ receptor
3. glomerulosclerosis	hepatocyte growth factor (HGF), Smad 6/7, dominant negative TGF- $\beta$ receptor
4. Alport syndrome	type IV collagen
5. tubulointerstitial nephritis	hepatocyte growth factor (HGF), Smad 6/7, dominant negative TGF- $\beta$ receptor

5

Transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) is a multi-functional cytokine, and plays important roles in tissue turnover, restoration of damaged tissues, and so on. In particular, TGF- $\beta$  induces the accumulation of extracellular matrix (ECM) as well as regulates the expression of ECM receptors such as integrin. An event shared by various progressive renal diseases including diabetic nephropathy is the accumulation of extracellular matrix (ECM) in the glomerular. Thus, the accumulation of ECM can be suppressed by inhibiting the expression or function of TGF- $\beta$ .

10

15

For example, decorin, which is one of small molecule dermatan sulfate proteoglycans, is a natural inhibitory factor to TGF- $\beta$ . The introduction of the gene (decorin cDNA) results in the reduction of the accumulation of ECM in the glomerular (Isaka, Y. et al., Nat. Med. 2: 418-423, 1996).

20

Furthermore, a molecule comprising the extracellular domain of TGF- $\beta$  receptor neutralizes TGF- $\beta$  and inhibits the function of TGF- $\beta$ . There are two types of TGF- $\beta$  receptors, type I and type II. TGF- $\beta$  binds to the type II receptor, and the resulting complex interacts with the type I receptor. Both type I and type II receptor fragments can be used to suppress TGF- $\beta$ , but the type II receptor fragment that

25

directly interacts with TGF- $\beta$  is used preferably. TGF- $\beta$  can be neutralized by expressing an inactivated TGF- $\beta$  receptor in which the signaling function has been disrupted. A certain effect can be produced by simply expressing the soluble receptor (Lin, H. Y. et al., J. Biol. Chem. 270: 2747-2754, 1995). However, significantly stronger effects can be produced by expressing, for example, a fusion molecule of the extracellular domain of TGF- $\beta$  receptor with IgG-Fc (for example, TGF-RII/Fc) (Isaka, Y. et al., Kidney Int. 55: 465-475, 1999; Isaka, Y. et al., J. Am. Soc. Nephrol. 7: 1735, 1996). The accumulation of ECM in the glomerular can be suppressed by expressing this molecule in renal cells. Likewise, it is possible to use a fusion protein of the extracellular domain of platelet-derived growth factor (PDGF) with Fc (Imai, R. and Y. Isaka, Nephron 83: 296-300, 1999; Isaka et al., Kidney Int. 52: Suppl. S100-S103, 1997). An antisense RNA molecule or ribozyme cleaving RNA can be introduced to suppress the expression of these genes. In contrast, the introduction of the TGF- $\beta$  gene may produce a therapeutic effect on acute glomerular damages or such. The TGF- $\beta$  gene can also be used to establish a renal disease model.

Smad is a family of signaling molecules which transduce the TGF- $\beta$  signal. The function of this gene family is regulated by gene transfer. For the suppression of the action of TGF- $\beta$ , it is particularly preferable to introduce the suppressive Smad gene, which suppressively regulates the TGF- $\beta$  signal. Such molecules include Smad6 and Smad7.

Hepatocyte growth factor (HGF) is a growth factor produced in mesenchymal cells, and regulates the proliferation of endothelial cells and epithelial cells in organs including liver and kidney. HGF also induces morphogenesis to form branched renal tubules. Additionally, HGF prevents acute kidney failure caused by ischemic or drug-induced tissue injury (Kawaida, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 4357-61, 1994). HGF therapy using mouse model for renal disease has been performed (Mizuno, S. et al., J. Clin. Invest. 101: 1827-34, 1998). Thus, HGF gene is important as a transgene in gene therapy targeting renal cells (Imai, R. and Y. Isaka, Nephron 83: 296-300, 1999). HGF is also useful to prevent progressive fibrosis

associated with renal diseases.

15-lipoxygenase (15-LO) is an enzyme that catalyzes the synthesis of 15-S-hydroxyeicosatetraenoic acid and lipoxin A<sub>4</sub> which antagonize the inflammatory action of leukotriene. The introduction  
5 of the 15-LO gene reportedly produces therapeutic effects in a glomerulonephrosis model (Yura, T. et al., J. Am. Soc. Nephrol. 6: 890, 1995; Imai, E. et al., Exp. Nephrol. 5: 112-117, 1995; Munger, K. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 13375-13380, 1999); thus, this gene can also be used for therapeutic purposes.

10 Exogenous genes that are particularly useful in gene transfer targeting renal cells (e.g. in gene therapies) may include those encoding:

- (1) cell cycle inhibitor (e.g. p53, p21, p16 and p27),
- (2) inhibitor of cell proliferation signal (e.g. mutant H-Ras),
- 15 (3) secretory cell proliferation inhibitor (e.g. eNOS and CNP (C type sodium diuretic peptide)),
- (4) vascular smooth muscle relaxing factor (e.g. eNOS and CNP),
- (5) vascular smooth muscle relaxing ion channel (e.g. C-terminal deletion mutant of Kir 6.2 potassium ion channel),
- 20 (6) thrombolytic protein (e.g. tissue plasminogen activator and urokinase),
- (7) tissue factor pathway inhibitor (TFPI),
- (8) angiogenic factor (e.g. VEGF, FGF, and HGF), and
- (9) superoxide dismutase (SOD) (e.g. including Cu/Zn type SOD, Mn  
25 type SOD, and EC-SOD)

One of advantages of the vector of the present invention is to achieve highly efficient gene transfer into renal interstitial cells. This advantage would enable gene therapy for various renal diseases. All human progressive renal diseases finally result in  
30 tubulointerstitial fibrosis. Persistent inflammation or recurrent injuries of the interstitium gradually damage kidney tissues, which often results in severe renal malfunction (Schainuck, L. I. et al., Hum. Pathol. 1: 631-641, 1970; Bohle, A. et al., Virchows Arch. 376: 211-232; Bohle, A. et al., Virchows Arch. 373: 15-22, 1977; Mackensen,  
35 S. et al., Nephron 24: 30-34, 1979). Interstitial fibrosis can sometimes be caused secondarily by glomerular or vascular damages.

The detailed mechanism underlying the progress of a renal disease to the final stage of renal failure has not been clarified. Some studies reported that the degree of not glomerular damage but tubulointerstitial damage can exactly correlates to the degrees of renal dysfunction and long-term prognosis (Risdon, R. A. et al., Lancet 2: 363-366, 1968; Schainuck, L. et al., Hum. Pathol. 1: 631-641, 1970).

The process leading to interstitial fibrosis can be assumed to be attributed to an aberrant prolongation of the normally regulated metabolic turnover of cell components and extracellular matrix. The interstitial fibroblast acquires the compound phenotype of so-called "myofibroblast" and, proliferate to infiltrate in residential areas which are actively inflamed (Alpers, C. et al., J. Am. Soc. Nephrol. 5: 201-210, 1994). Then, these cells induce the synthesis of extracellular matrix and enhance local fibrosis. Accordingly, the gene transfer technology targeting interstitial fibroblast allows evaluation of *in-vivo* effects of a particular molecule in the interstitium. Furthermore, this technology is also important to develop a method of treating interstitial fibrosis.

Gene therapy can be performed by *in vivo* administration of a composition comprising the Paramyxovirus vector directly or indirectly into a kidney to express an exogenous gene in renal cells. Alternatively, the therapy may be carried out by *ex-vivo* administration. The *in-vivo* gene transfer can be achieved, for example, by local administration, such as injection of the vector from the renal artery or renal vein, direct injection into a kidney, backflow from the urinary tract, and backflow from the renal pelvis. In addition, indirect administration into renal cells can be achieved, for example, by systemic administration or administration to other organs. The *ex-vivo* gene transfer can be achieved, for example, by administration of the vector to the surgically removed kidney, in such a manner as injection into the renal artery or renal vein, direct injection into the kidney, backflow from the urinary tract, and backflow from the renal pelvis. Alternatively, the gene can be introduced by preparing renal cells from the organ or such, and incubating the cells with the vector of the present invention. The

renal cells into which the gene has been introduced can be returned to, for example, the kidney.

For treatment and prevention, the Paramyxoviral vector for gene transfer into renal cells is administered at a sufficient dose that ensures the introduction of an effective amount of the vector into renal cells. The term "effective amount" refers to an amount that ensures the introduction of the gene into renal cells by the method of the present invention, which produces a desired therapeutic or preventive effect at least in part. The administration of an effective amount of the Paramyxoviral vector of the present invention comprising a desired gene results in the production of the transgene product in cells where the vector has been introduced. This induces alterations in the phenotypes of the cells and/or the surrounding renal cells (specifically, induction or suppression of the expression of the transgene and other genes, and the morphological, biochemical alterations, etc.). Preferably, the administration of an effective amount of the vector of the present invention comprising the desired gene to a kidney leads to the introduction of the gene into a significant number of cells in the kidney as well as the induction of alterations in the phenotypes of the cells. The term "a significant number of cells" means that the gene has been introduced by the vector of the present invention into at least about 0.1%, preferably about 1% or more, more preferably about 5% or more, still more preferably about 10% or more, most preferably about 20% or more of target renal cells at the administration site. The target renal cells include, for example, interstitial cells, glomerular cells, renal tubular cells, mesangial cells, epithelial cells, and endothelial cells.

The achievement of gene transfer into cells can be confirmed by an assay method known to those skilled in the art. The transcript of a gene can be detected and quantified, for example, by Northern hybridization, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), or RNA protection assay. The detection by Northern hybridization, RT-PCR or such can also be carried out *in situ*. The detection of the translation product can be carried out by Western blotting using an antibody, immunoprecipitation, RIA, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), pull-down assay, etc. To easily detect



the achievement of gene transfer, the protein to be expressed can be tagged or a reporter gene can be inserted so as to ensure its expression. The reporter gene includes, but not limited to, genes encoding  $\beta$ -galactosidase, chloramphenicol acetyltransferase (CAT), alkaline phosphatase, and green fluorescent protein (GFP).

A dose of the vector may vary depending on the disease, the body weight, age, sex, symptom, the purpose of administration, the transgene, a formulation of a composition to be administered, a method of administration, and so on, but it can be appropriately determined by those skilled in the art. The dose of the vector may be preferably within the range of approximately  $10^5$  pfu/ml to  $10^{11}$  pfu/ml, and more preferably approximately  $10^7$  pfu/ml to  $10^9$  pfu/ml, but most preferably approximately  $1 \times 10^8$  pfu/ml to  $5 \times 10^8$  pfu/ml, with pharmaceutically acceptable carriers.

The composition of the present invention comprising the virus vector may be administered into subjects including all mammalian animals including humans, monkeys, mice, rats, rabbits, sheep, cattle, and dogs.

#### Brief Description of the Drawings

Fig. 1 is a photograph showing the result observed under a fluorescence stereoscopic microscope, which shows a frontal section of the rat kidney surgically removed on the fourth day after administration of SeV/GFP from the renal artery. Intense fluorescent signals are detected in a wide area of cortical part as well as medullar part.

Fig. 2 is a photograph showing the result observed under a fluorescence stereoscopic microscope, which shows a frontal section of the rat kidney surgically removed on the fourth day after administration of SeV/GFP from the urinary tract. Intense fluorescent signals are detected in a wide area of cortical part as well as medullar part.

Fig. 3 is photographs of a kidney tissue section stained with an antibody against GFP. The section was obtained on the fourth day after administration of SeV/GFP from the renal artery. Positive signals are diffusively detected in interstitial fibroblast cells.

Each part of the tissue is assigned in the lower panel.

Fig. 4 presents photographs of a kidney tissue section stained with an antibody against GFP. The section was obtained on the fourth day after administration of SeV/GFP from the urinary tract. Positive signals are diffusively detected in interstitial fibroblast cells. Each part of the tissue is assigned in the lower panel.

Fig. 5 presents photographs of a kidney tissue section stained with an antibody against GFP. The section was obtained on the fourth day after administration of SeV/GFP from the renal artery. GFP antibody-positive stains were also recognized in the glomerulus; about 20% of the glomerulus was found to be infected with the vector. Glomerular portions are indicated in the lower panel. Infiltrating cells are shaded.

Fig. 6 presents photographs of a kidney tissue section stained with an antibody against GFP. The section was obtained on the fourth day after administration of SeV/GFP from the urinary tract. Positive signals are detected in renal tubular epithelial cells. In addition, macrophages are found to infiltrate. Each part of the tissue and cell are assigned in the lower panel. Infiltrating cells are shaded.

Fig. 7 is a photograph of a kidney tissue section stained with an antibody against GFP. The section was obtained on the seventh day after administration of SeV/GFP from the renal artery. GFP antibody-positive stains are recognized in glomeruli.

Fig. 8 is a photograph of a kidney tissue section stained with an antibody against GFP. The section was obtained on the seventh day after administration of SeV/GFP from the renal artery. GFP antibody-positive stains are recognized in interstitial cells and glomeruli.

Fig. 9 is a photograph of a kidney tissue section stained with an antibody against GFP. The section was obtained on the seventh day after administration of SeV/GFP from the renal artery. GFP antibody-positive stains are recognized.

Fig. 10 is a photograph of a kidney tissue section stained with an antibody against GFP. The section was obtained on the 14th day after administration of SeV/GFP from the renal artery.

Fig. 11 is a photograph of a kidney tissue section stained with

an antibody against GFP. The section was obtained on the 14th day after administration of SeV/GFP from the renal artery.

Fig. 12 is a photograph of a kidney tissue section stained with an antibody against GFP. The section was obtained on the 14th day after administration of SeV/GFP from the renal artery.

Fig. 13 is a photograph of a kidney tissue section stained with an antibody against GFP. The section was obtained on the 14th day after administration of SeV/GFP from the renal artery.

Fig. 14 is a photograph of a kidney tissue section stained with an antibody against GFP. The section was obtained on the 28th day after administration of SeV/GFP from the renal artery.

Fig. 15 is a photograph of a kidney tissue section stained with an antibody against GFP. The section was obtained on the 28th day after administration of SeV/GFP from the renal artery.

#### Best Mode for Carrying out the Invention

The present invention will be explained in detail below with reference to Examples, but it is not to be construed as being limited thereto. All references and publications (including references, patents and published patent applications) cited herein are incorporated herein by reference in their entireties.

#### [Example 1] Construction and preparation of recombinant Sendai virus vector comprising the GFP gene (GFP/SeV) for kidney administration

The recombinant Sendai virus vector comprising the GFP gene (GFP/SeV) was constructed based on the description of Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587 and Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466, as follows:

First, a DNA sample comprising the cDNA nucleotide sequence of the GFP gene (the length of structure gene = 717 bp), was prepared. The DNA sample was purified until the plasmid was observed as a single band at 25 ng/ $\mu$ l or a higher concentration in electrophoresis. In order to amplify and collect a desired gene fragment from the sample, a primer pair comprising synthetic forward DNA sequence and reverse DNA sequence (antisense strand) were prepared; the primers contained a NotI restriction site sequence; the below-described transcription

end sequence (E), intervening sequence (I), and transcription start sequence (S); and a portion of the GFP gene sequence.

The forward synthetic DNA sequence contains ACTT at the 5'-terminus, the NotI recognition site "GCGGCCGC" at the 3'-side thereof, and a spacer sequence at the 3'-side thereof. Further to the 3'-side thereof, the sequence corresponding to the first 25 nucleotides of the ORF starting from the initiation codon ATG of a desired cDNA was attached.

The reverse synthetic DNA sequence contains ACTT at the 5'-terminus the NotI recognition sequence "GCGGCCGC" at the 3'-side thereof, and a spacer oligo DNA for adjusting the length of the primer at the 3'-side thereof. The length of the oligo DNA was designed so as to be a multiple of 6 nucleotides including the NotI recognition sequence GCGGCCGC, the sequence complementary to the cDNA, and the EIS sequence derived from the Sendai virus genome as described below (so-called "rule of six"; Kolakofski D. et al., J. Virol., 1998, 72, 891-899; Calain P. and Roux L., J. Virol., 1993, 67, 4822-4830). Furthermore, to the 3'-side of the added sequence, complementary sequences to the S sequence of the Sendai virus (5'-CTTTCACCCT-3' (SEQ ID NO: 1)), to the I sequence (5'-AAG-3') and to the E sequence (5'-TTTTTCTTACTACGG-3' (SEQ ID NO: 2)) were added. Finally, to the 3'-side, the complementary sequence corresponding to 25 nucleotides upstream from the termination codon of the desired cDNA was added to be a 3'-terminus of the reverse synthetic oligo DNA.

PCR was performed with Vent polymerase (NEB). The amplified fragment was digested with NotI, and inserted into the NotI site of the plasmid vector pBluescript. The nucleotide sequence of the obtained PCR product was confirmed by an automated DNA sequencer, and a plasmid having the correct sequence was selected.

Recombinant Sendai virus genomic cDNA was constructed according to the methods described in Kato A. et al., EMBO J., 1997, 16, 578-598 and Hasan M. K. et al., J. Gen. Virol., 1997, 78, 2813-2820. A spacer sequence of 18 bp containing the NotI site (5'-(G)-CGGCCGCAGATCTTCACG-3'; SEQ ID NO: 3) was inserted into a cloned Sendai virus genomic cDNA (pSeV(+)) at the locus between the leader sequence and the 5'-terminus of a sequence encoding the N

protein to obtain the plasmid pSeV18<sup>+</sup>b(+) containing a self-cleavable ribozyme site derived from the antigenomic strand of the hepatitis delta virus (Hasan M. K. et al., J. General Virol., 1997, 78, 2813-2820). The above-mentioned DNA encoding GFP was digested with NotI, and inserted into the cDNA plasmid of Sendai virus genome pSeV18<sup>+</sup>b(+) at the NotI site to obtain a recombinant Sendai virus cDNA comprising the GFP gene.

The recombinant Sendai virus cDNA prepared as described above was transcribed *in vitro* or in cells to reconstitute the virus, thereby obtaining the recombinant viral vector as follows.

Cells of the monkey kidney cell line LLCMK2 were cultured to be 70 to 80% confluent ( $1 \times 10^6$  cells) in minimal essential medium (MEM) comprising 10% fetal calf serum (FCS) and antibiotics (100 units/ml penicillin G and 100  $\mu$ g/ml streptomycin) in 6-well plastic plates. The recombinant vaccinia virus vTF7-3 expressing T7 polymerase was inactivated by UV irradiation (Fuerst, T. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8122-8126, 1986, Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996), and the cells were infected with the virus at 2 PFU/cell. One hour after infection, 3 to 5  $\mu$ g recombinant Sendai virus cDNA was co-transfected with plasmids (1  $\mu$ g pGEM-N, 0.5  $\mu$ g pGEM-P, and 1  $\mu$ g pGEM-L) (Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996) expressing trans-acting viral proteins essential for the production of full-length Sendai virus genome by lipofection using Superfect (QIAGEN). The transfected cells were cultured in serum-free MEM supplemented with only 100  $\mu$ g/ml rifampicin (Sigma) and 40  $\mu$ g/ml cytosine arabinoside (AraC) (Sigma). Optimal concentrations for these agents were determined so as to minimize the cytotoxicity of vaccinia virus and to maximize virus yield (Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579). 48 hours after transfection, the cells were harvested and disrupted by three cycles of freeze-thawing, and then inoculated into the allantoic membrane of 10-day-old embryonated eggs. After three days, the allantoic fluid was collected, and the virus titer was determined by measuring hemagglutination activity (HA). HA was determined by the "endo-point dilution method" (Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579; Yonemitsu, Y. & Kaneda, Y., "Hemagglutinating virus of Japan-liposome-mediated gene delivery to

vascular cells.", Baker A. H. (ed.), Molecular Biology of Vascular Diseases. Method in Molecular Medicine, Humana Press, pp. 295-306, 1999). In order to exclude vaccinia virus vTF7-3 samples whose titers might be  $10^3$  to  $10^4$  pfu/ml or lower, the allantoic fluid samples were  
5 diluted  $10^6$  fold, and the dilutes were used to re-propagate the viruses in embryonated eggs. This procedure was repeated three times or more. The allantoic fluids obtained were stored at  $4^\circ\text{C}$  as sample solutions for administration to kidney. Based on the HA value, the virus titer was estimated to be  $2 \times 10^9$  pfu/ml.

10 [Example 2] Construction and preparation of Sendai virus vector lacking the F gene

(1) Construction of Sendai virus genome cDNA lacking the F gene and an expression plasmid for F gene

15 Full length Sendai virus (SeV) genomic cDNA, pSeV18<sup>+</sup>b(+) (Hasan M. K. et al., J. General Virol., 1997, 78, 2813-2820) (pSeV18<sup>+</sup>b(+) may be also called pSeV18<sup>+</sup>), was digested with SphI and KpnI, and the resulting fragment (14673 bp) was recovered and cloned into pUC18 to obtain pUC18/KS. pUC18/KS was used for constructing a region  
20 lacking the F gene. Deletion of the F gene was performed by combination of PCR and ligation, and the ORF of the F gene (1698 bp, from ATG to TGA) was replaced with the sequence 5'-atgcatgccggcagatga (SEQ ID NO: 4) to construct the F gene-deleted SeV genomic cDNA (pSeV18<sup>+</sup>/ΔF). PCR was performed using the forward primer  
25 (5'-gttgagtactgcaagagc/SEQ ID NO: 5) and the reverse primer (5'-tttgccggcatgcatgtttcccaaggggagagttttgcaacc/SEQ ID NO: 6) for amplification of the upstream of the F gene, and the forward primer (5'-atgcatgccggcagatga/SEQ ID NO: 7) and the reverse primer (5'-tggtgaatgagagaatcagc/SEQ ID NO: 8) for amplification of the  
30 downstream of the F gene, and the PCR products were ligated using EcoT22I. The resulting plasmid was digested with SacI and SalI, and the fragment containing the F gene deletion site (4931 bp) was recovered and cloned into pUC18 to obtain pUC18/dFSS. pUC18/dFSS was digested with DraIII, and the fragment recovered was replaced with  
35 the DraIII fragment of pSeV18<sup>+</sup> comprising F gene, and ligated to obtain pSeV18<sup>+</sup>/ΔF.

Then, the EGFP gene was amplified by PCR to construct a cDNA comprising the EGFP gene at the F deletion site (pSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFP). The length of EGFP gene was adjusted to be a multiple of 6 (Hausmann, S. et al., RNA 2, 1033-1045 (1996)) by PCR using a NsiI-tailed primer (5'-atgcatatggtgatgcggttttggcagtac:sequence SEQ ID NO: 9) for 5'-terminus, and a NgoMIV-tailed primer (5'-tgccggctattattacttgtacagctcgtc:sequence SEQ ID NO: 10) for 3'-terminus. The PCR products were digested with restriction enzymes NsiI and NgoMIV. The resulting fragments were recovered from the gel and then ligated with pUC18/dFSS between the restriction enzyme sites of NsiI and NgoMIV located at the F deletion site, followed by sequencing. A DraIII fragment comprising the EGFP gene was excised from the plasmid and was substituted for the DraIII fragment located in a region comprising the F gene in pSeV18<sup>+</sup>. After ligation, the plasmid pSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFP was obtained.

(2) Preparation of helper cells inducibly expressing the SeV-F protein

A Cre/loxP inducible expression plasmid for the F gene of Sendai virus (SeV-F) was constructed as follows. The SeV-F gene was amplified by PCR and its sequence was confirmed. The PCR product was inserted into the unique SmaI site of the pCALNdLw plasmid, which had been designed so that the expression of gene products could be induced by Cre DNA recombinase (Arai, T. et al., J. Virol. 72, 1115-1121 (1998)). The plasmid pCALNdLw/F was thus obtained.

To recover infective virus particles from the F gene-deleted genome, a helper cell line expressing SeV-F protein was established. LLC-MK2 cells, derived from the Simian kidney and commonly used for SeV propagation, were used. LLC-MK2 cells were cultured at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in MEM containing 10% heat-inactivated and immobilized fetal bovine serum (FBS), 50 U/ml of penicillin G sodium, and 50 µg/ml streptomycin. Because of the cytotoxicity of the SeV-F gene product, the gene was cloned into the pCALNdLw, where the expression of a cloned gene was inducible by Cre DNA recombinase. The above pCALNdLw/F was used to transfect LLC-MK2 cells by the calcium phosphate method (mammalian transfection kit (Stratagene)) according to the protocol.

LLC-MK2 cells grown in 10-cm plates to be 40% confluent were transfected with 10 µg pCALNdLw/F and incubated in 10 ml of MEM

containing 10 % FBS at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> for 24 hr. Then, cells were detached, resuspended in 10 ml of culture medium, and plated onto five 10-cm dishes so that 5 ml of cell suspension was plated onto one dish, 2 ml onto two, and 0.2 ml onto two. Cells were cultured in 10 ml of MEM containing 10% FBS plus 1200 µg/ml G418 (GIBCO-BRL) for 14 days while the medium was changed every two days, and stable transfectants were selected. Thirty clones grown in the medium that are resistant to G418 were recovered using cloning rings. Cells of each clone were further cultured to be 100% confluent in a 10-cm dish.

To induce F protein expression, cells were grown to be 100% confluent in 6 cm dishes, and infected with AxCANCre adenovirus at moi = 3 according to the method by Saito et al. (Saito et al., *Nucleic Acids Res.*, 1995, 23, 3816-3821; Arai T. et al., *J. Virol.*, 1998, 72, 1115-1121).

(3) Reconstitution and propagation of the F gene-deleted SeV virus  
LLC-MK2 cells were transfected with the plasmid pSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFP described above, in which the enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene as a reporter had been inserted into the F deletion site according to the 6n rule, as follows.

LLC-MK2 cells were plated at 5x 10<sup>6</sup> cells/dish onto 100-mm petri dishes, cultured for 24 hr, and then infected at room temperature for 1 hr with the recombinant vaccinia virus expressing T7 RNA polymerase, which had been treated with psoralen and long UV (365 nm) for 20 min (Fuerst T. R. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83, 8122-8126) (moi = 2) (preferably moi = 2 to 3; more preferably moi = 2). UV exposure was performed using UV Stratainker 2400 equipped with five 15-watt bulbs (catalogue number 400676 (100 V), Stratagene, La Jolla, CA, USA). After cells were washed three times, plasmids pSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFP, pGEM/NP, pGEM/P, and pGEM/L (Kato A. et al., *Genes Cells*, 1996, 1, 569-579) were resuspended in OptiMEM (GIBCO) at a ratio of 12 µg/dish, 4 µg/dish, 2 µg/dish, and 4 µg/dish, respectively, and mixed with SuperFect transfection reagent (5 µl SuperFect (QIAGEN) for 1 µg DNA). The mixture was incubated for 10 min at room temperature, then resuspended in 3 ml of OptiMEM containing 3% FBS, and added to the cells. After a 3-hr culturing in an incubator, cells were washed twice with serum free MEM, and further cultured.



in MEM containing 40 µg/ml of cytosine β-D-arabinofuranoside (AraC, Sigma) and 7.5 µg/ml of trypsin (GIBCO) for 70 hr. Then, cells were collected and resuspended in OptiMEM at 10<sup>7</sup> cells/ml. Cells were frozen-thawed three times, mixed with lipofection reagent DOSPER (Boehringer mannheim) (10<sup>6</sup> cells per 25 µl DOSPER), incubated at room temperature for 15 min, and used to transfect LLC-MK2/F7 cells (10<sup>6</sup> cells/well in 12-well-plate), which were one of the clones of F gene-expressing helper cells selected as described above. The cells were cultured in serum free MEM containing 40 µg/ml of AraC and 7.5 µg/ml of trypsin, and the culture supernatant was collected.

[Example 3] In-vivo administration of Sendai virus vector into kidney

(1) Administration of the virus from the renal artery

Six-week-old Sprague Dawley (SD) rats (male, weight 160 to 180 g) were used. The animals were anesthetized with Nembutal; the original solution of Nembutal was diluted 10 fold with saline, and then given to the peritoneal cavity in a 1/100 ml volume of the weight. The animals were laparotomized by median incision. The left kidney and the renal artery were exposed by removing adhered tissues such as adipose tissues. A 24-G catheter was inserted into the left renal artery to perfuse with physiological saline and administer the virus. Furthermore, to prevent the backflow to the abdominal aorta, the renal artery was clamped at a portion proximal to the abdominal aorta. Kidney perfusion was carried out using several hundreds µl of physiological saline. After perfusion with saline, 300, 500 or 700 µl of a sample solution comprising the virus (titer 2x 10<sup>9</sup> pfu/ml), which had been prepared in Example 1, was administered with 1-ml syringes. After the catheter was removed, the puncture was closed using Aronalpha<sup>TM</sup> (Toagosei Co., Ltd.). After 5 minutes, the clamp was removed and the abdomen was closed using a Michel's clip.

(2) Administration of the virus from the urinary tract

Six-week old Sprague Dawley (SD) rats (male, weight 160-180 g) were used. The animals were anesthetized with Nembutal; the original solution of Nembutal was diluted 10 fold with saline, and then given to the peritoneal cavity in a 1/100 ml volume of the weight. The animals were laparotomized by median incision. The left kidney and

the urinary tract were exposed. A 26-G needle was inserted into the urinary tract, and then 300, 500 or 700  $\mu$ l of a sample solution comprising the virus (GFP/SeV) (titer  $2 \times 10^9$  pfu/ml), which had been prepared in Example 1, was administered to the kidney, while the left renal vein was clamped. After 5 minutes, the clamp was removed and the abdomen was closed using a Michel's clip.

### (3) Collection of kidney samples and preparation of sections

The kidney samples were collected 4, 7, 14, 21 and 28 days after viral administration. The rats were anesthetized with Nembutal and then laparotomized. In order to perfuse the kidney, the upper part of the abdominal aorta, which branches into the renal artery, was blocked with an artery forceps, and a winged needle was inserted into the lower part of the abdominal aorta, which branches into the renal artery. Physiological saline (20 ml) was injected into the artery to remove blood, then the kidney was surgically removed. The kidney was sliced into frontal sections, and fixed in a methacarn solution (methanol : chloroform : acetic acid = 9:6:1) prepared immediately before resection. The fixed sample was embedded in paraffin according to the standard method, and 4- $\mu$ m thickness of paraffin sections were prepared. Deparaffinization was carried out using xylene and a serial dilution of ethanol.

### (4) Immunohistochemical staining

The reactivity to anti-GFP antibody (rabbit polyclonal antibody; Molecular Probes, Oregon, USA) and anti-ED-1 antibody (mouse monoclonal antibody, Serotec, Oxford, England) against macrophage was determined to identify virus-infected tissues and to evaluate infiltration into cells. The sections prepared by the method described above were treated with a mixed solution of methanol and hydrogen peroxide (9:1) at room temperature for 5 minutes to inactivate the endogenous peroxidase. After washing three times with PBS solution (for 10 minutes), the sample sections were treated with a blocking agent for 20 minutes at room temperature (the blocking agent was selected from the following combination: 5% goat serum for the rabbit antibody; 5% horse serum for the mouse monoclonal antibody; 200  $\mu$ l each). The sections were incubated at 4°C for 16 hours with each of the primary antibodies that had been diluted 50 fold. The

section samples were washed three times with cold PBS, and then incubated with a secondary antibody. The secondary antibodies used were: biotinylated goat anti-rabbit IgG(H+L) antibody (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) for confirming the presence of GFP (diluted 150 times); and biotinylated horse anti-mouse IgG(H+L) antibody (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) for confirming the presence of macrophage (diluted 150 fold). The reaction with the antibodies was conducted at room temperature for 30 minutes. The sections were washed three times with a cold PBS solution for 10 minutes. The samples were incubated with avidin-biotinylated (Vector; according to the instructions attached to the avidin-biotinylation kit) horseradish peroxidase complex at room temperature for 30 minutes. Coloration reaction was carried out with a DAB solution. After the termination of the reaction, the sample sections were counterstained with methyl green.

(5) GFP expression on non-fixed kidney sections four days after virus administration observed under fluorescence microscopy

Frontal sections were prepared from the surgically removed non-fixed kidney and observed under a fluorescence stereoscopic microscope (light source for fluorescence: excitation wavelength, 425nm; emission wavelength, 480nm) to fluorescently confirm the expression of GFP derived from the administered GFP/SeV. All the samples used for the fluorescence observation were obtained 4 days after administration of 500 µl of virus liquid from the renal artery or urinary tract. The results are shown in Fig. 1 (administration from the renal artery) and Fig. 2 (administration from the urinary tract). Intense fluorescence signals were detected over a wide area of cortical part as well as medullar part.

(6) Immunohistochemical staining of samples 4 days after administration

The result obtained using the anti-GFP antibody shows that, when the virus administered from the renal artery or urinary tract, interstitial fibroblast cells were diffusively infected with the virus (Figs. 3 and 4). In the case of administration from the renal artery, GFP antibody-positive stains were recognized in the glomeruli; infected glomeruli were found to be about 20% of the total

glomeruli (Fig. 5). The antibody-positive cells in the glomerulus were thought to be mesangial cells. It should be noted that no infiltration of inflammatory macrophages is found in GFP-positive glomeruli and near interstitial cells obtained by administration from the renal artery. In the case of administration from the urinary tract, strong GFP expression was detected in epithelial cells of renal pelvis, and infected cells were observed diffusively among interstitial cells and renal tubular epithelial cells (Fig. 6). In the case of administration from the urinary tract, the expression was found not only in distal renal tubule but also in the proximal renal tubule. Furthermore, in the case of administration from the urinary tract, a considerable number of macrophages infiltrated in tissues surrounding the renal tubule. The difference in the degree of induction of infiltration between the administration routes can be attributed in part to the activity of renal tubular epithelial cells as the antigen-presenting cells.

(7) Immunohistochemical staining of samples 7, 14, 21 and 28 days after administration

Six-week-old male SD rats were used, and administration was carried out from the renal artery throughout this experiment. The volume of virus liquid administered was 700  $\mu$ l/individual; the titer of GFP/SeV was  $2 \times 10^9$  pfu/ml in the liquid. As a result of immunohistochemical staining, GFP antibody-positive stains were detected for the samples prepared any sampling days after administration (7 days, Figs. 7 to 9; 14 days, Figs. 10 to 13). Almost no infiltration of macrophage was found near the interstitial cells and glomerular cells which were confirmed to be infected. In this administration experiment, GFP antibody-positive stains were recognized in renal tubular epithelial cells obtained in any sampling days (28 days, Figs. 14 and 15), although such stains were not detected 4 days after administration from the renal artery. In samples 28 days after administration, cell infiltration was recognized near GFP antibody-positive renal tubular cells in some cases. This shows a sign of the damage in renal tubular interstitium.

Industrial Applicability

Although sufficiently highly efficient gene transfer into renal cells was not achieved with conventional vectors, the present invention using a Paramyxoviral vector made it possible to introduce genes into renal cells with very high efficiency by only short-time  
5 contact with the vector. The present invention provides a basic technology to achieve gene therapy targeting renal cells.

## CLAIMS

1. A method of introducing a gene into a renal cell, wherein the method comprises contacting a Paramyxovirus vector with the renal  
5 cell.

2. The method according to claim 1, wherein the method further comprises administering the Paramyxovirus vector into a blood vessel.

3. The method according to claim 2, wherein the blood vessel is renal artery.

10 4. The method according to claim 1, wherein the method further comprises administering the Paramyxovirus vector into urinary tract.

5. The method according to any one of claims 1 to 4, wherein the renal cell is selected from the group consisting of an interstitial cell, a glomerular cell and a renal tubular cell.

15 6. The method according to any one of claims 1 to 5, wherein the Paramyxovirus is Sendai virus.

7. A Paramyxovirus vector for gene transfer into a renal cell.

8. A composition for gene transfer into a renal cell, wherein the composition comprises a Paramyxovirus vector or a cell comprising  
20 the vector.

9. The composition according to claim 8, wherein the composition is administered into a blood vessel.

10. The composition according to claim 9, wherein the blood vessel is renal artery.

25 11. The composition according to claim 8, wherein the composition is administered into urinary tract.

12. The composition according to any one of claims 8 to 11, wherein the renal cell is selected from the group consisting of an interstitial cell, a glomerular cell and a renal tubular cell.

30 13. The composition according to any one of claims 8 to 12, wherein the Paramyxovirus is Sendai virus.

## ABSTRACT

The present invention provides a viral vector that ensures highly efficient gene transfer into renal cells and its use. The use  
5 of a Paramyxovirus vector enables gene transfer into renal cells with high efficiency. The gene transferred by *in vivo* administration can be continuously expressed in the renal cells over a prolonged period. The vector of the present invention is suitably used in gene therapy for kidney.